

Université de Montréal

**Synthèse de thioalcynes macrocycliques tripeptidiques par couplage croisé**

*Par*

Sacha NGUYEN THANH

Département de chimie, Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise

en chimie

Mars 2020

© Sacha NGUYEN THANH, 2020

Université de Montréal

Unité académique : Département de chimie / Faculté des arts et des sciences

---

*Ce mémoire intitulé*

**Synthèse de thioalcynes macrocycliques tripeptidiques par couplage croisé**

*Présenté par*

**Sacha NGUYEN THANH**

*A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes*

**Stephen Hannessian**

Président-rapporteur

**Shawn Collins**

Directeur de recherche

**William Lubell**

**Stephen Hannessian**

Membre du jury

## Résumé

Avec les réactions de macrocyclisation, il est possible d'ajouter de nouveaux groupements chimiques dans le macrocycle afin d'influencer ses propriétés biologiques. Les thioalcynes sont des groupements fonctionnels peu présents dans les macrocycles qui pourraient offrir de nouvelles possibilités de composés utilisables en chimie médicinale et qui ouvrent également la voie à plusieurs possibilités de diversification grâce à leur réactivité prévisible. Par conséquent, la mise au point d'une méthode de synthèse permettant formation de macrocycles peptidiques contenant des thioalcynes est intéressante. Ce mémoire présente ainsi le développement d'une stratégie de synthèse pour la formation de macrocycles tripeptidiques via la formation d'un connecteur thioalcyne par couplage croisé catalysé par un système  $[\text{Cu}(\text{MeCN})_4]\text{PF}_6/\text{dtbbpy}/2,6\text{-lutidine}$ . Cette méthode a permis la synthèse de 4 macrocycles tripeptidiques possédant un thioalcyne avec des rendements compris entre 30% et 58%. Nous montrons aussi des possibilités de diversifications des macrocycles par l'utilisation du thioalcyne des macrocycles comme réactif.

**Mots-clés :** macrocyclisation, couplage peptidique, catalyse au cuivre, thioalcyne

## Abstract

Macrocyclization gives the opportunity to incorporate new functional groups in macrocycles to influence their biological properties. Rarely seen in macrocycles, alkynyl sulfides are functional groups that could be introduced into interesting compounds for applications in medicinal chemistry due to their ability to open new opportunities for diversification of the macrocyclic framework with its predictable reactivity. Consequently, the development of a synthetic strategy for the synthesis of macrocycles containing alkynyl sulfide in their structure is of interest. This thesis presents the development of a synthetic strategy for the formation of macrocyclic tripeptides using an alkynyl sulfide linker which is formed by cross coupling employing a  $[\text{Cu}(\text{MeCN})_4]\text{PF}_6/\text{dtbbpy}/2,6\text{-lutidine}$  catalytic system. This method was used to generate 4 macrocyclic alkynyl sulfide tripeptides with yields ranging between 30% and 58%. This thesis also shows different possibilities for the diversification the macrocycle framework by using the alkynyl sulfide linker as a building block.

**Keywords :** macrocyclization, peptide coupling , copper catalysis , alkynyl sulfide.

# Table des matières

|  |    |
|--|----|
| Résumé.....  | 3  |
| Abstract .....   | 4  |
| Table des matières .....   | 5  |
| Liste des tableaux.....  | 7  |
| Liste des figures.....   | 8  |
| Liste des schémas.....   | 9  |
| Liste des sigles et abréviations.....  | 11 |
| Remerciements .....  | 13 |
| Chapitre 1. Introduction.....  | 15 |
| 1.1    Macrocycle: définition et synthèse .....  | 15 |
| 1.1.1    Définition d'un macrocycle .....  | 15 |
| 1.1.2    Les difficultés autour de leur synthèse .....   | 16 |
| 1.1.3    Macrocycle peptidique.....  | 16 |
| 1.2    Synthèse de macrocycle peptidique.....  | 17 |
| 1.2.1    Par couplage peptidique .....   | 17 |
| 1.2.2    Macrocyclisation par utilisation des groupes latéraux d'un peptide.....               | 18 |
| 1.2.3    Macrocyclisation par cycloaddition catalysée .....                                    | 20 |
| 1.2.4    Modification des acides aminés pour la macrocyclisation par métathèse d'oléfine ..... | 20 |
| 1.2.5    Activation C-H de phénol pour la synthèse d'arylomycine .....                         | 21 |
| 1.3    Connecteur pour la macrocyclisation : historique et difficulté.....                     | 22 |
| 1.4    Les thioalcynes.....  | 25 |

|  |   |    |
|--|---|----|
| 1.5  | Historique .....  | 25 |
| 1.5.1  | Synthèse par dehydrohalogenation .....  | 25 |
| 1.5.2  | Synthèse via une stratégie Umpolung .....   | 25 |
| 1.5.3  | Utilisation d'un iode hypervalent pour la synthèse de thioalcyne .....                              | 26 |
| 1.5.4  | Synthèse catalytique par cuivre (I).....  | 27 |
| 1.6  | Synthèse de macrocycle dérivé de la cystéine .....  | 29 |
| 1.7  | Objectifs de projet .....   | 31 |
| Chapitre 2. Synthèse de macrocycle tripeptidique par la formation d'un thioalcyne..... |   | 32 |
| 2.1  | Développement d'une retrosynthèse pour les macrocycles tripeptidiques.....                          | 32 |
| 2.2  | Développement d'une stratégie de synthèse de macrocycle tripeptidique possédant un thioalcyne ..... | 33 |
| 2.3  | Macrocyclisation de tripeptide par formation d'un thioalcyne .....                                  | 38 |
| 2.4  | Inclusion du tryptophane dans le macrocycle.....  | 41 |
| 2.5  | Inclusion d'un acide aminé quaternaire dans le macrocycle .....                                     | 42 |
| 2.6  | Inclusion du propargyle glycine dans le macrocycle .....  | 44 |
| Conclusion .....   |   | 48 |
| Références bibliographiques.....   |   | 49 |
| Chapitre 3. Informations Supplémentaires.....  |   | 52 |
| Générale .....   |   | 52 |
| Annexe.....  |   | 54 |

## Liste des tableaux

|   |    |
|---|----|
| Tableau 1. – Exemples de thioalcyne synthétisés par couplage croisé entre un bromure d'alcyne et un thiol.....                  | 29 |
| Tableau 2. – Optimisation pour la macrocyclisation par formation d'un thioalcyne .....  | 30 |
| Tableau 3. – Différents macrocycles produits par couplage croisé entre un thiol et un bromure d'alcyne .....                    | 30 |
| Tableau 4. – Déprotection acide de l'acide aminé <b>2.18</b> .....  | 36 |
| Tableau 5. – Rendement de la déprotection du tripeptide <b>2.20</b> selon le temps de réaction ..                               | 39 |
| Tableau 6. – Rendements de la macrocyclisation du tripeptide <b>2.24</b> selon la température ...                               | 39 |
| Tableau 7. – Rendement du couplage peptidique de l'acide aminé <b>2.19</b> avec Acc <b>2.35</b> selon l'agent de couplage ..... | 43 |
| Tableau 8. – Macrocycles dipeptidiques synthétisés par couplage croisé entre un thiol et un bromure d'alcyne .....              | 47 |

## Liste des figures

|   |    |
|---|----|
| Figure 1. – Exemples de macrocycles.....  | 15 |
| Figure 2. – Réactions de macrocyclisation dépendant de la concentration .....   | 16 |
| Figure 3. – Différence entre cyclisation de de tête à queue et cyclisation de chaine latéral à chaine latéral .....                               | 19 |
| Figure 4. – Synthèse de l'ocytocine par formation d'un pont disulfure via oxydation à l'aire..  | 19 |
| Figure 5. – Macrocyclisation via lactonisation .....  | 23 |
| Figure 6. – Macrocyclisation par substitution nucléophile.....  | 23 |
| Figure 7. – Macrocyclisation par métathèse d'oléfine .....  | 24 |
| Figure 8. – Macrocyclisation par cycloaddition entre un alcyne et un azoture (CuAAC) .....  | 24 |
| Figure 9. – Structure (gauche) et réactivité (droite) d'un thioalcyne .....   | 25 |
| Figure 10. – Formation d'un iode hypervalent EBS.....   | 26 |
| Figure 11. – Mécanisme de réaction de la formation d'un thioalcyne .....  | 27 |
| Figure 12. – Synthèse catalytique de thioalcynes par couplage croisé et mécanismes de réaction plausible .....                                    | 28 |
| Figure 13. – Rétrosynthèse d'un macrocycle tripeptidique possédant un thioalcyne et les deux méthodes possibles pour la synthèse peptidique ..... | 33 |
| Figure 14. – Structure du <i>L</i> -tryptophane et exemple de composés médicaux possédant un indole ou un tryptophane (en rouge) .....            | 41 |



## Liste des schémas

|   |    |
|---|----|
| Schéma 1. – Synthèse de l'endoline A par couplage peptidique.....   | 18 |
| Schéma 2. – Synthèse de cyclo-[(L)Pro-(L)Val-ψ(triazole)-(L)Pro-(L)Tyr] par macrocyclisation via cycloaddition azoture-alcyne.....  | 20 |
| Schéma 3. – Schéma de synthèse du macrocycle <b>1.7</b> par métathèse d'oléfine.....  | 21 |
| Schéma 4. – Synthèse d'arylomycine par activation de lien C-H des phénols .....   | 22 |
| Schéma 5. – Synthèse de thioalcyne par dehydrohalogenation d'un thioéthylène.....   | 25 |
| Schéma 6. – Synthèse de thioalcyne par réaction S <sub>N</sub> 2 d'un sel de Bunte avec un réactif de Grignard .....  | 26 |
| Schéma 7. – Couplage peptidique de la cystéine <b>2.1</b> et la leucine <b>2.2</b> et déprotection par saponification du dipeptide <b>2.3</b> .....   | 34 |
| Schéma 8. – Bromination de l'alcyne terminal <b>2.5</b> et estérification avec acide aminé <b>2.8</b> .....   | 34 |
| Schéma 9. – Couplage peptidique de la cystéine <b>2.11</b> et la <i>N</i> -Boc- <i>L</i> -leucine <b>2.2</b> et déprotection par saponification pour l'obtention du dipeptide <b>2.13</b> ..... | 35 |
| Schéma 10. – Bromination de l'alcyne terminal <b>2.15</b> et estérification avec acide aminé <b>2.17</b> ..   | 36 |
| Schéma 11. – Synthèse du tripeptide <b>2.20</b> par couplage peptidique.....  | 37 |
| Schéma 12. – Synthèse du tripeptide <b>2.20</b> par couplage peptidique.....  | 38 |
| Schéma 13. – Couplage de l'acide aminé <b>2.19</b> avec <i>N</i> -Boc- <i>L</i> -phénylalanine et déprotection par action du TFA .....  | 40 |
| Schéma 14. – Synthèse du tripeptide <b>2.29</b> par couplage peptidique et la déprotection du thiol .....   | 40 |
| Schéma 15. – Synthèse du macrocycle <b>2.30</b> par couplage croisé entre le thiol et le bromure d'alcyne du tripeptide <b>2.29</b> .....   | 41 |
| Schéma 16. – Couplage de l'acide aminé <b>2.19</b> avec tryptophane et déprotection du groupement Fmoc .....  | 42 |
| Schéma 17. – Synthèse du macrocycle <b>2.40</b> possédant Acc.....  | 44 |
| Schéma 18. – Couplage de l'acide aminé <b>2.19</b> avec propargyle glycine .....  | 44 |
| Schéma 19. – Synthèse du macrocycle <b>2.46</b> possédant propargyle glycine.....   | 45 |

|  |    |
|--|----|
| Schéma 20. – Diversification orthogonale du macrocycle <b>2.46</b> ..... | 46 |
|--|----|

## Liste des sigles et abréviations

|                  |  |
|------------------|--|
| Ac               | Acetate  |
| aq               | aqueux   |
| Boc              | <i>tert</i> -butoxycarbonyl  |
| C                | Celsius  |
| Cbz              | Carboxybenzyle   |
| CuAAC            | Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition  |
| Cy               | Cyclohexane  |
| DBU              | 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène   |
| DIPEA            | Diisopropylethylamine  |
| DCM              | Dichloromethane  |
| DMF              | Diméthylformamide  |
| dtbbpy           | <i>ditert</i> butylbipyridine  |
| EDC              | 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide  |
| Et               | Ethyle   |
| Fmoc             | fluorénylméthoxycarbonyle  |
| HATU             | Hexafluorophosphate de (diméthylamino)-N,N-diméthyl(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridin-3-yloxy)méthaniminium |
| HOAt             | 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole   |
| HOBt             | Hydroxybenzotriazole   |
| Hz               | Hertz  |
| IrAAC            | Iridium-catalyzed azide-alkyne cycloaddition   |
| <i>m</i> CPBA    | acide metachloroperbenzoïque   |
| Me               | Methyl   |
| NNM              | N-Méthylmorpholine   |
| Ns               | Sulfonyle  |
| Ph               | Phenyl   |
| PDP              | ( <i>S,S</i> )-1,1'-bis(2-pyridinylmethyl)-2,2'-bipyrrolidine  |
| Pda              | polydiacteylene  |
| <sup>t</sup> Bu  | <i>tert</i> -butyl   |
| T <sub>3</sub> P | Anhydride acide propanephosphonique  |
| TA               | Temperature ambiante   |
| TEA              | Triethylamine  |
| TESH             | Triethylsilane   |
| THF              | Tetrahydrofurane   |
| TFA              | acide trifluoroacetic  |
| TIPSH            | Triisopropylsilane   |
| Trt              | Trityl   |
| Ts               | Tosyl  |
| Xphos            | 2-Dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropylbiphenyl  |

*À ma famille*

## Remerciements

Je souhaiterais remercier mon directeur de recherche Pr. Shawn K. Collins pour m'avoir fait confiance et de m'avoir accepté dans son groupe. Merci également pour ton soutien et ton aide qui m'a guidé tout le long de ma maîtrise. Je souhaite également remercier tous les membres du groupe que j'ai pu croiser durant mes études, Jeffrey Santandrea, Antoine Caron, Shawn Parisien-Collette, Éric Godin, Émilie Morin, Clementine Minozzi, Javier Guerrero-Morales, Johann Sosoe, Christina Gagnon, Corentin Cruché et Jean-Christophe Grenier-Petel pour leur bonne ambiance et leur patience quand c'était à moi de jouer durant nos parties de tarot. Malgré ma timidité, vous m'avez accepté parmi vous et vous m'avez motivé à sortir un peu plus de ma bulle.

Merci également aux anciens stagiaires Mathieu Morency, Xavier Abel-Snape, Florian D'Ambra, and Milan Vander Wee, Corentin Pochet, Noémi Beaucage et Bastien Rey. En espérant que vous avez apprécié votre expérience au sein du groupe.

Un grand merci à Cynthia Crifar du groupe du Pr. William Lubell pour m'avoir supervisé durant mon stage chez ce dernier, et qui a continué à me motiver tout le long de ma maîtrise. Mon expérience avec toi restera une de mes meilleures expériences.

Merci également à mon groupe d'amis du bac, sans eux, ma vie à Montréal n'aurait pas été aussi incroyable. En espérant que nos chemins restent parsemés de bon moment de rigolade et de blagues douteuses.

Je souhaite remercier ma mère Risa Cohen, mon père Jean-Claude Nguyen et mes sœurs Zoé et Rosie Nguyen pour me soutenir durant toutes mes études. Les mots me manquent pour vous dire à quel point je vous aime. Malgré le fait que nous soyons tous dans des pays différents, j'ai toujours pu compter sur vous dans mes pires moments, et pour cela, je resterai toujours reconnaissant. Merci encore une fois.

Finally, I would like to thank a very special person, my grandmother Gloria Cohen. You gave me motivation and support for the entirety of my studies. You are one of my biggest

inspirations and I learned so much from you. I can't thank you enough for everything you did for me and for the family. I love you Nana.

Cette maitrise aura été une des plus grandes expériences de ma vie. Quand j'ai commencé, mon esprit était rempli de doutes et d'interrogations sur mon futur. Je ne suis toujours pas sûr de ce que je suis et de ce que je veux, mais la plus grande leçon que j'ai apprise durant ces études est que le futur restera toujours mystérieux et que rester sur place ne mènera à rien. La vie est un livre dont les pages sont vierges, il est temps pour moi de devenir l'écrivain.

# Chapitre 1. Introduction

## 1.1 Macrocycle: définition et synthèse

### 1.1.1 Définition d'un macrocycle

Les macrocycles sont des composés possédant une structure cyclique de 12 carbones ou plus<sup>[1]</sup>. Ils sont principalement caractérisés par leur structure plus restreinte, les liaisons simples d'un macrocycle ont, en effet, une rotation libre bien moins importante que pour les macromolécules non cycliques. Par conséquent, les macrocycles ont une conformation structurale plus limitée que leurs homologues non cycliques, ce qui, potentiellement, peut améliorer leur sélectivité et leur bioactivité en bloquant la molécule sur une conformation qui favorise les interactions avec une enzyme. Historiquement, les macrocycles potentiellement utilisables en médecine ont pour origine commune les produits naturels. Certains macrocycles sont présent dans l'organisme vivant comme la porphyrine<sup>[2]</sup>, composant essentiel de l'hémoglobine (figure 1), composant essentiel pour le transport de l'oxygène dans le corps. D'autres produits naturels utilisés en médecine sont des macrocycles comme la cyclosporine A<sup>[3]</sup>, utilisée comme immunosuppresseur, ou encore la vancomycine<sup>[2]</sup>, utilisée comme antibiotique.

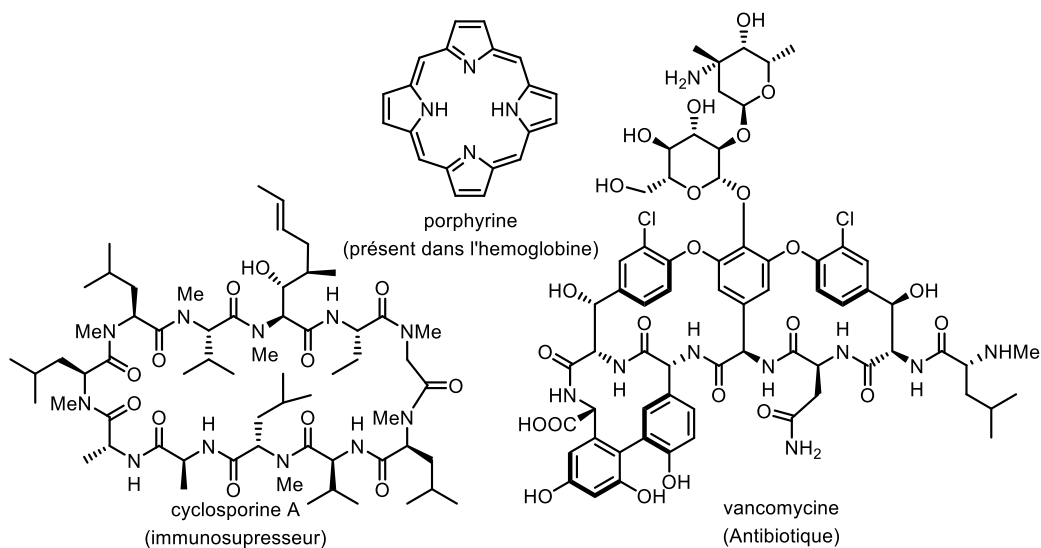


Figure 1. — Exemples de macrocycles

### 1.1.2 Les difficultés autour de leur synthèse

Les macrocycles sont donc des composés de grand intérêt en chimie médicinale. Cependant, leur synthèse pose plusieurs difficultés. Le précurseur demande généralement beaucoup d'étapes avant d'être utilisable pour la macrocyclisation. En plus de ça, les réactions de macrocyclisation dépendent de la capacité des précurseurs linéaires à s'organiser pour que ses extrémités réactives soient à une distance favorable à la macrocyclisation. Cependant, les composés linéaires ont tendance à prendre une conformation qui éloigne leurs extrémités pour limiter les tensions allyliques et les encombrements stériques au sein de la molécule<sup>[4]</sup>. Les réactions de macrocyclisation ont donc tendance à former à haute concentration des polymères en produit secondaire (figure 2). Par conséquent, les réactions de macrocyclisation demandent d'être faites dans des milieux très dilués pour limiter les réactions intermoléculaires et possèdent généralement un rendement faible<sup>[1]</sup>. Trouver une méthode de synthèse pour produire facilement des macrocycles avec de bons rendements permettrait alors l'obtention de nouvelles macromolécules avec un grand potentiel en chimie médicinal.

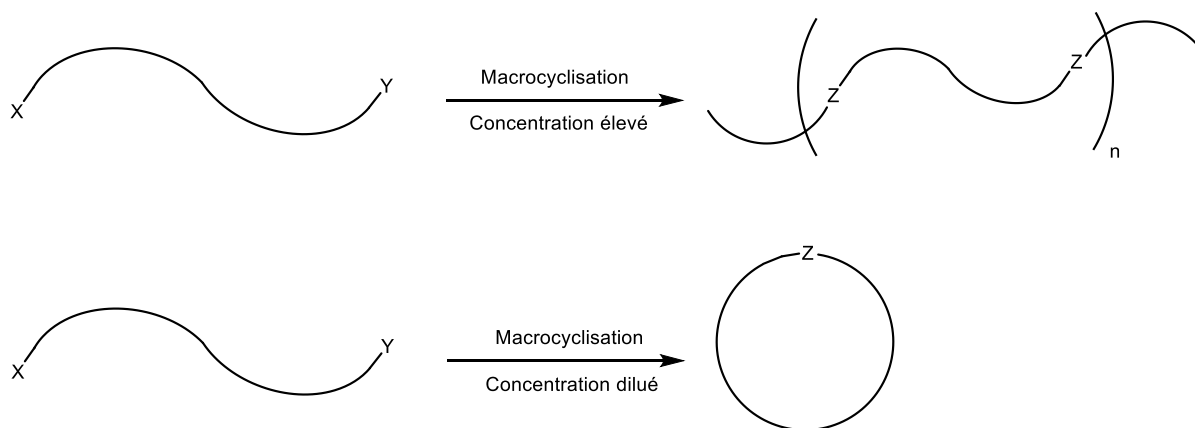


Figure 2. – Réactions de macrocyclisation dépendant de la concentration

### 1.1.3 Macrocycle peptidique

Les macrocycles peptidiques sont, comme leur nom l'indique, des peptides dont la structure forme un cycle. Depuis quelques années, le nombre de macrocycles peptidiques a drastiquement augmenté dû à leurs propriétés biologiques intéressantes<sup>[3]</sup>. Cela ouvre un large panel de composés possiblement utilisables en chimie médicinale ou autre.



Une problématique commune avec les peptides est leurs instabilités dans l'organisme, principalement dues aux interactions avec les peptidases dans le corps, qui provoque la dégradation des peptides<sup>[3]</sup>. De plus, les peptides sont des molécules avec un grand nombre de liaisons rotative, rendant le ciblage difficile et diminuant ainsi leur action biologique. En formant des macrocycles avec des peptides, ces derniers voient leur structure restreinte, limitant d'une part les interactions avec les peptidases, et d'autre part diminuent les rotations des liens simples et facilite le ciblage de la molécule en la bloquant dans une conformation<sup>[5]</sup>. Tous ces avantages dus à la macrocyclisation des peptides fait que l'activité biologique des peptides est en majorité plus importante après macrocyclisation et facilite leur pénétration dans la membrane cellulaire<sup>[3]</sup>, ouvrant plus de possibilité de traitement en médecine. Des exemples de synthèse de macrocyclisation de peptides sont présentés ci-dessous. Les exemples sélectionnés ne se veulent pas compréhensifs, mais pour montrer les difficultés associées à la synthèse de macrocycle peptidique.

## **1.2 Synthèse de macrocycle peptidique**

### **1.2.1 Par couplage peptidique**

La façon la plus simple pour la macrocyclisation est le couplage peptidique entre les deux extrémités d'un peptide linéaire. Pr. Ye et son groupe ont ainsi mis en place la synthèse du macrocycle bioactif endolide A (schéma 1) avec un rendement global de 16%<sup>[6]</sup>. La stratégie de synthèse repose sur un couplage de Negishi pour la synthèse du 3-(3-furyl)alanine **1.2** suivie d'un enchaîne de couplage peptidique dirigé par HATU. La macrocyclisation se fait finalement par couplage peptidique utilisant comme agent de couplage l'anhydride propylphosphonique (T<sub>3</sub>P) pour obtenir un rendement de macrocyclisation de 45% pour l'endolide A.

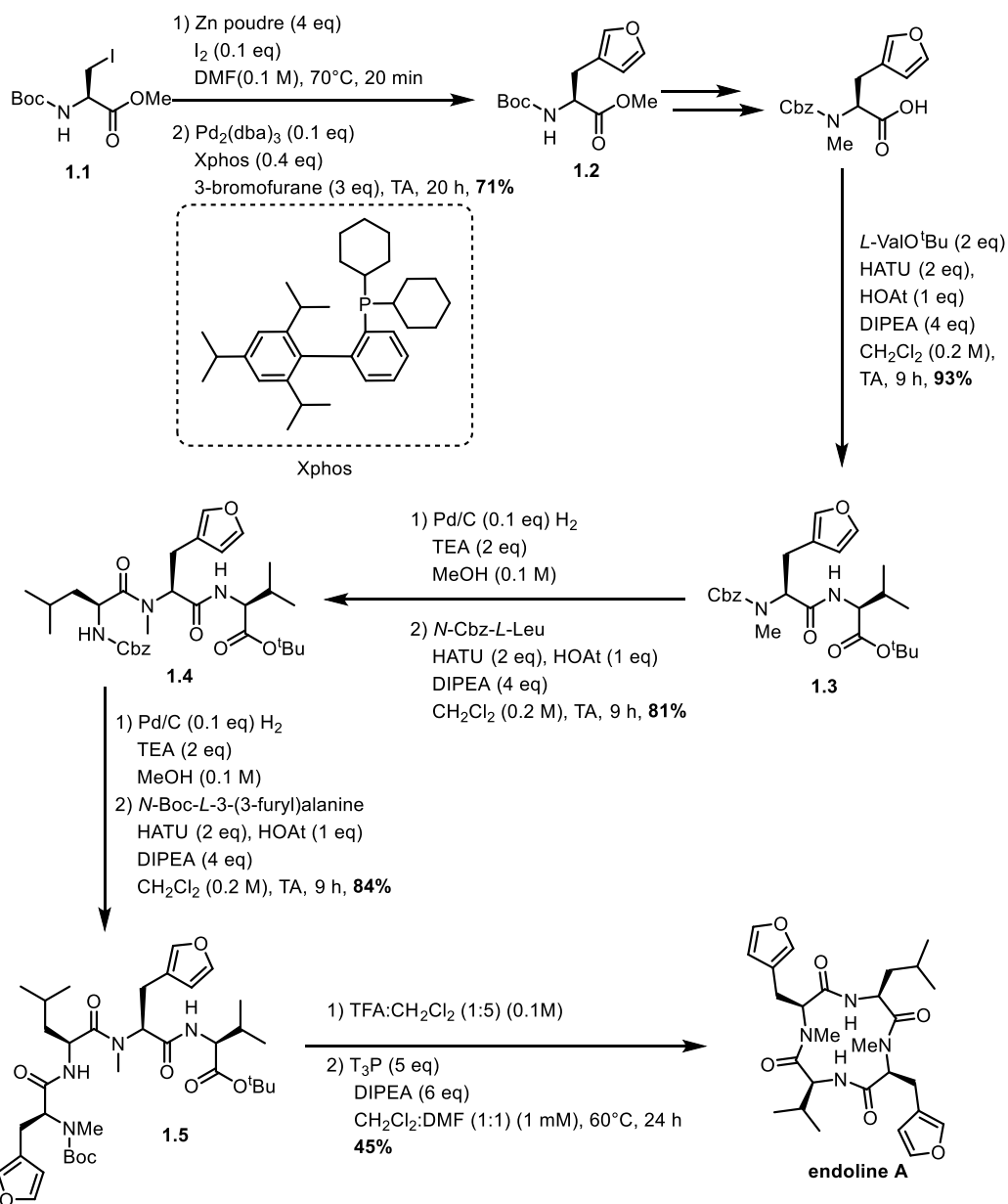


Schéma 1. – Synthèse de l'endoline A par couplage peptidique

### 1.2.2 Macrocyclisation par utilisation des groupes latéraux d'un peptide

En macrocyclisation peptidique, il est important de savoir la différence entre la cyclisation de tête à queue (Head-to-Tail) et la cyclisation de chaîne latérale à chaîne latérale (Side chain-to-Side chain). La cyclisation de tête à queue se fait lorsque le cycle est fermé par la formation d'un groupement amide entre le groupement amine terminal et le groupement carboxyle terminale d'une chaîne

peptidique. La cyclisation de chaîne latérale à chaîne latérale, quant à elle, signifie que la cyclisation se fait entre deux chaînes latérales d'un peptide<sup>[7]</sup> (figure 3).

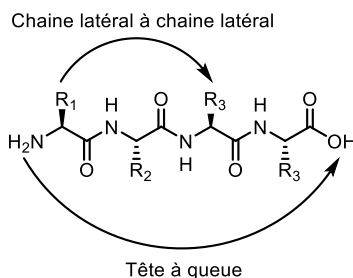


Figure 3. – Différence entre cyclisation de de tête à queue et cyclisation de chaîne latérale à chaîne latérale

Pr. Du Vigneau montre un exemple de cyclisation de chaîne latérale à chaîne latérale avec la synthèse de l'ocytocine où la chaîne peptidique possède deux cystéines dont les thiols sont protégés par des groupements benzyles. La deprotection des cystéines se fait par du sodium dans l'ammoniaque liquide, la macrocyclisation se fait alors par la formation d'un pont disulfure via oxydation à l'air en solution aqueuse pour obtenir l'ocytocine. Les analyse de l'activité biologique de l'ocytocine synthétisé ont ensuite conclue que ce dernier possède une activité biologique similaire à l'ocytocine naturel<sup>[8]</sup>.

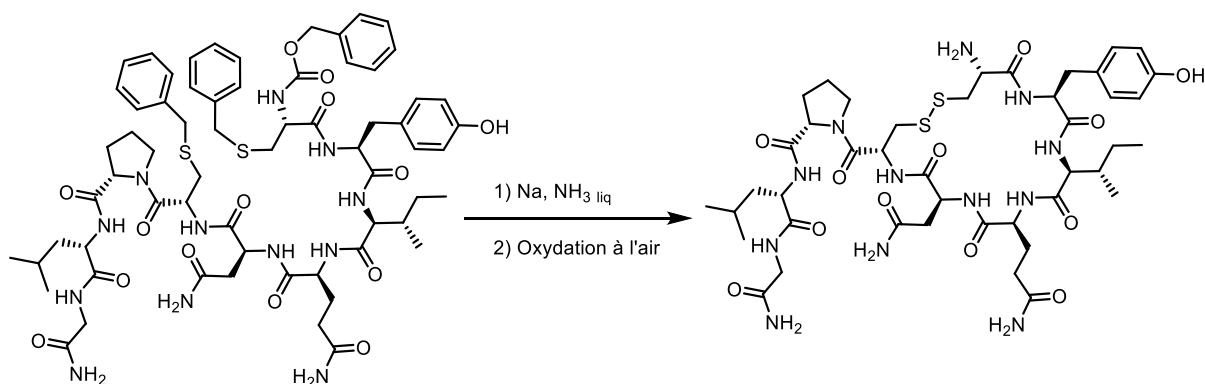


Figure 4. – Synthèse de l'ocytocine par formation d'un pont disulfure via oxydation à l'air

### 1.2.3 Macrocyclisation par cycloaddition catalysée

Il est souvent difficile de synthétiser des macrocycles peptidiques de petite taille par couplage peptidique ou lactamisation. Non seulement les chances de polymérisation sont élevées, mais les tensions au sein de la chaîne peptidique peuvent rendre la macrocyclisation impossible<sup>[9]</sup>. Les 1,2,3-triazoles sont alors intéressants pour résoudre ce genre de problème. En plus d'avoir des propriétés similaires aux amides<sup>[10]</sup>, leur synthèse est facilement faisable via cycloaddition catalysée au cuivre entre un alcyne et un azoture (ou CuAAC). C'est ce que montre Pr. Van Maarseveen pour la synthèse du macrocycle cyclo-[(L)Pro-(L)Val-ψ(triazole)-(L)Pro-(L)Tyr] (Figure 3) dont la macrocyclisation se fait très bien par CuAAC avec 70% de rendement alors que la macrocyclisation par lactamisation ne donnait qu'un mélange de dimères et d'oligomère<sup>[9]</sup>.

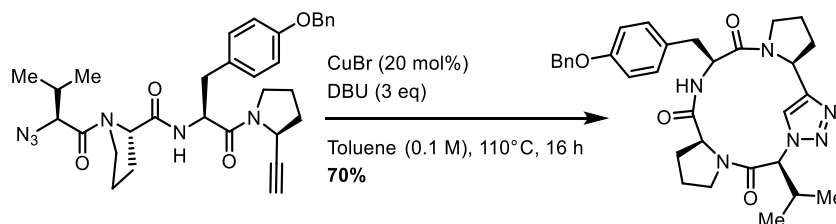


Schéma 2. – Synthèse de cyclo-[(L)Pro-(L)Val-ψ(triazole)-(L)Pro-(L)Tyr] par macrocyclisation via cycloaddition azoture-alcyne

### 1.2.4 Modification des acides aminés pour la macrocyclisation par métathèse d'oléfine

Il est possible de modifier certains acides aminés naturels pour qu'ils possèdent des fonctions utilisables pour la macrocyclisation qu'on ne pourrait pas obtenir avec des acides aminés naturels. Pr. White montre un exemple où la proline du tripeptide **1.6** subit une oxydation catalysée par un catalyseur de fer(PDP) suivi par une réaction de Wittig pour donner le tripeptide **1.7**<sup>[11]</sup>. Une saponification du peptide suivi d'un couplage peptidique avec le *D*-allylglycine **1.8** donne le tetrapeptide **1.9**. La macrocyclisation se fait par métathèse d'oléfine à l'aide d'un catalyseur de ruthénium, Grubbs I, pour former le macrocycle avec 69% de rendement. La macrocyclisation est suivie par une hydrogénation au palladium sur charbon pour donner le macrocycle **1.11** avec 90% de rendement (schéma 2).

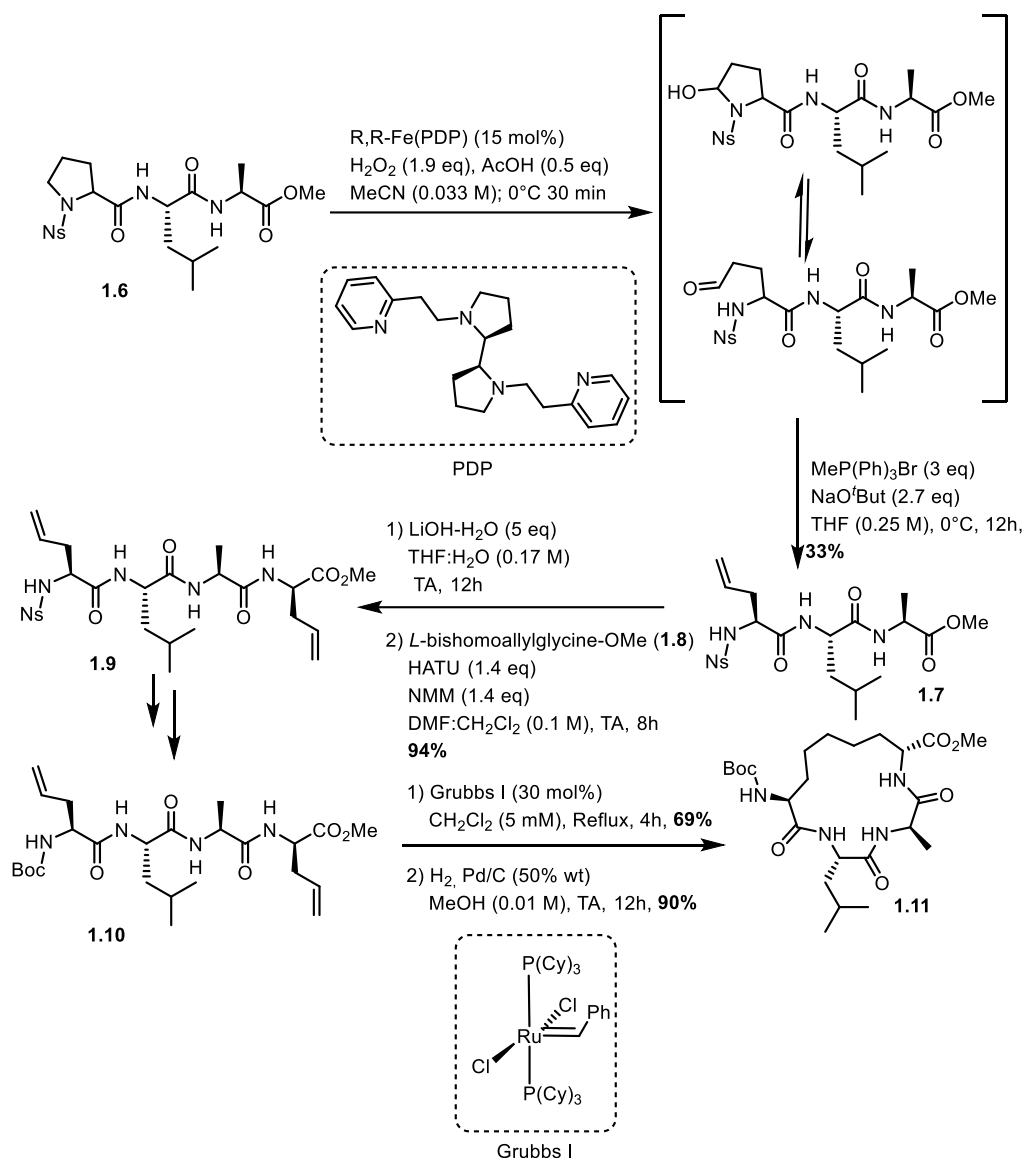


Schéma 3. – Schéma de synthèse du macrocycle **1.7** par métathèse d'oléfine

### 1.2.5 Activation C-H de phénol pour la synthèse d'arylomycine

Les arylomycines sont une classe de produit naturel ayant des activités antibactériennes prometteuse<sup>[12]</sup>. La principale difficulté pour la synthèse des arylomycine est la fermeture du cycle qui demande de former une liaison C-C entre deux cycles aromatiques, généralement faits par couplage de Suzuki<sup>[12]</sup>, cela demande la diversification des groupements aromatique, augmentant le nombre d'étapes dans la synthèse générale<sup>[12]</sup>. Pr. Baran a mis au point une stratégie de synthèse où la fermeture du cycle se fait par une un couplage oxydant de deux phénols dirigés

par un complexe de cuivre(III) pour synthétiser la partie cyclique de l'arylomycine avec un rendement global de 41%<sup>[13]</sup> (schéma 3).

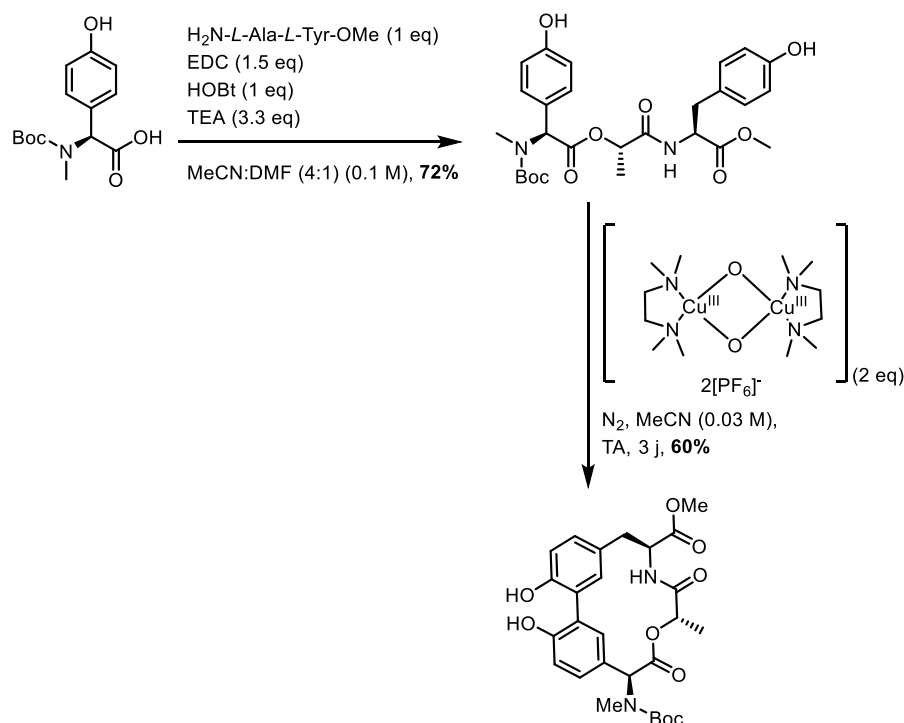


Schéma 4. – Synthèse d'arylomycine par activation de lien C-H des phénols

### 1.3 Connecteur pour la macrocyclisation : historique et difficulté

Pour la synthèse de macrocycle, deux groupements chimiques réagissent ensemble pour former un connecteur qui permet la fermeture du cycle, ces groupements chimiques peuvent être changer pour donner différents connecteurs qui peuvent influencer les propriétés biologiques du macrocycle. Les connecteurs utilisés les plus courants pour la macrocyclisation sont des groupes fonctionnels bien connus. Les esters sont de loin les connecteurs les plus populaires pour former des lactones via activation stœchiométrique d'un seco acide<sup>[14]</sup> (figure 4). La macrolactamisation est également possible via la formation d'un amide avec un acide aminé<sup>[14]</sup>.

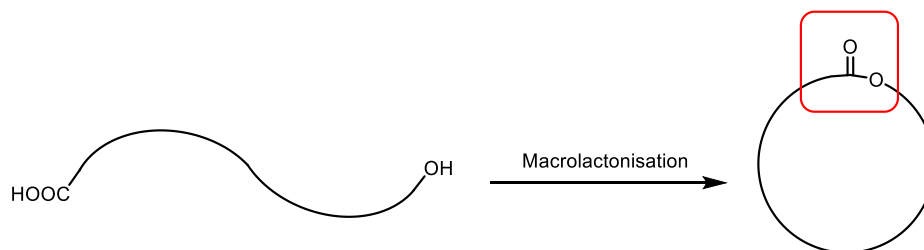


Figure 5. – Macrocyclisation via lactonisation

Une autre réaction populaire pour la macrocyclisation est la substitution nucléophile d'un alcool ou un thiol pour former un éther ou un thioéther (figure 5). Les composés possédant un éther ou un thioester sont des composants d'intérêt en chimie médicinale<sup>[15]</sup>. Ces méthodes sont aussi utilisées pour des substitutions nucléophiles aromatiques. Cette méthode s'avère utile pour la synthèse d'éther couronne et thioéther couronne<sup>[2]</sup>.

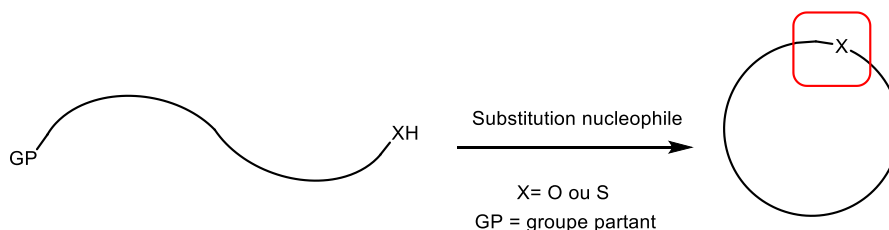


Figure 6. – Macrocyclisation par substitution nucléophile

Des réactions catalytiques de macrocyclisation ont également été utilisées. La fermeture de cycle par métathèse d'oléfine (RMC) est une réaction où deux alcènes terminaux subissent une redistribution de leurs liaisons double, résultant en la formation d'une double liaison C-C pour refermer le cycle (figure 6)<sup>[16]</sup>. Les réactions de métathèse d'oléfine font partie des réactions les plus communes et les plus efficaces. En plus d'apporter de la rigidité au macrocycle, la présence d'un alcène dans le macrocycle ouvre également des possibilités de diversification comme l'époxydation ou l'hydrogénation<sup>[16, 17]</sup>. Il est cependant nécessaire de pouvoir contrôler la stéréosélectivité de la réaction car les deux isomères *Z* et *E* de l'alcène formé sont possible dépendant de la taille du précurseur, de la conformation des alcènes de l'oléfine ou encore du catalyseur utilisé<sup>[18]</sup>.

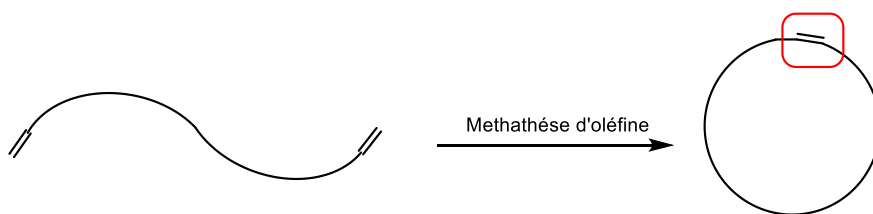


Figure 7. – Macrocyclisation par métathèse d'oléfine

Les réactions de cycloaddition sont également de bons exemples de macrocyclisation catalysée. La cycloaddition d'alcyne avec des azotures catalysée par le cuivre (CuAAC) a été utilisée pour la synthèse de macrocycle<sup>[19]</sup> (figure 8). Cette réaction donne pour connecteur le 1,2,3-triazole qui peut servir d'isotère d'amide<sup>[10]</sup>. De ce fait, la réaction CuAAC est un outil intéressant pour la synthèse de macrocycle à partir d'alcyne terminal.

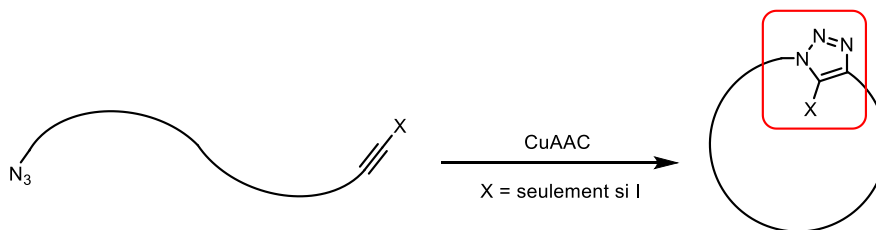


Figure 8. – Macrocyclisation par cycloaddition entre un alcyne et un azoture (CuAAC)

Le problème des exemples montrés ci-dessus est que peu de diversifications sont possibles après la macrocyclisation, les lactones et les lactames sont difficilement fonctionnalisables, de même pour les éthers. Les possibilités de diversification des oléfines sont limitées et sont généralement des réactions d'hydrogénation<sup>[16]</sup>. La cycloaddition offre la possibilité d'ajouter des fonctions sur le 1,2,3-triazole final, mais cela est rare. Les connecteurs formés après la macrocyclisation pourraient être utilisés pour ajouter de nouvelles fonctions intéressantes en pharmaceutique comme des marqueurs fluorescents ou encore des marqueurs d'affinités et il est dommage de voir si peu d'utilités à ces connecteurs. Il faudrait, pour cela, un connecteur qui offrirait la possibilité de diversifier le macrocycle après sa formation.



## 1.4 Les thioalcynes

Pour développer de nouvelles stratégies de macrocyclisation, le connecteur formé après la macrocyclisation doit donner une fonction connue capable de donner de nombreuses possibilités de diversification. Les thioalcynes (figure 8) sont un type d'alcyne substitué par un hétéroatome qui a des applications dans de nombreux domaines<sup>[20]</sup>. Leur géométrie et réactivité prédictive (figure 8) ainsi que leur synthèse accessible en fait un candidat de choix en tant que connecteur pour la macrocyclisation<sup>[21-23]</sup>. De plus, le lien C<sub>sp</sub>-S est peu représenté dans la structure cyclique d'un macrocycle<sup>[24]</sup>.

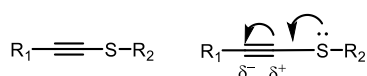


Figure 9. – Structure (gauche) et réactivité (droite) d'un thioalcyne

## 1.5 Historique

### 1.5.1 Synthèse par dehydrohalogenation

La première méthode de synthèse de thioalcyne se base sur la dehydrohalogenation de thioéthylènes en milieux basique<sup>[25]</sup> (schéma 4). Le précurseur bis-alkyl-thioéthylène **1.12** est mis en présence de KOH donnant une réaction hautement exothermique. Le thioalcyne **1.13** est ensuite isolé par distillation. Cette méthode a permis de donner le tert-butylthioacetylene **1.13** avec 60% de rendement.

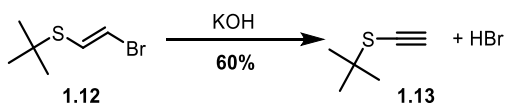


Schéma 5. – Synthèse de thioalcyne par dehydrohalogenation d'un thioéthylène

### 1.5.2 Synthèse via une stratégie Umpolung

Des méthodes de synthèse récente pour la synthèse de thioalcyne reposent sur l'utilisation de thiol électrophile<sup>[26]</sup>. Le bromure d'alkyle **1.14** sont convertis en sel de S-alkylthiosulfate **1.15** (ou sel de Bunte) rendant le thiol électrophile<sup>[27]</sup>. Une source d'alcyne nucléophile comme un réactif

de Grignard est alors couplé avec le thiol pour former le thioalcyne<sup>[26]</sup>. Si les rendements sont bons, donnant par exemple le (4-bromobenzyl)(hex-1-yn-1-yl)sulfane **1.16** avec un rendement global de 88% (schéma 5), ce genre de réaction demande cependant des conditions difficiles pour être mis en place pour une réaction de macrocyclisation.

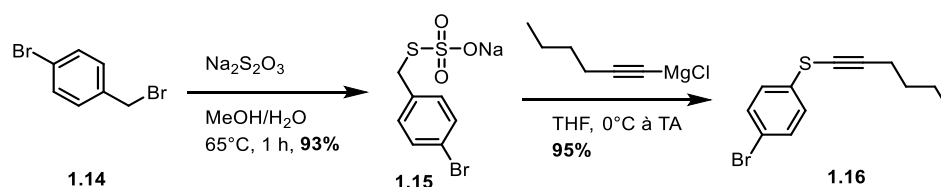


Schéma 6. – Synthèse de thioalcyne par réaction  $S_N2$  d'un sel de Bunte avec un réactif de Grignard

### 1.5.3 Utilisation d'un iode hypervalent pour la synthèse de thioalcyne

Une méthode encore plus récente repose sur l'alkylation du thiol via l'utilisation d'un iode hypervalent. Ce dernier est formé via la méthode de Olofsson avec l'alcyne possédant un groupe partant **1.18** et l'acide-2-iodobenzoïque **1.17** oxydé préalablement par *m*CPBA en milieu acide. Cette réaction donne alors un ethynylbenzoiodosilaxone **1.20** (figure 9)<sup>[28]</sup>.

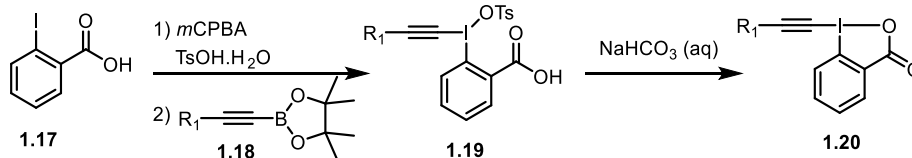


Figure 10. – Formation d'un iode hypervalent EBS

Pour la réaction du thiol avec EBX, deux mécanismes sont supposés pour cette réaction, soit le thiol fait une substitution sur l'iode pour donner l'intermédiaire **1.21** suivi d'une élimination réductrice pour donner le thioalcyne (figure 10 mécanisme A), soit le thiol fait une addition conjuguée sur l'alcyne donnant l'intermédiaire **1.22** suivi d'une  $\alpha$ -élimination (figure 10 mécanisme B)<sup>[29]</sup>. Dans les deux cas, nous obtenons le thioalcyne **1.23** avec un sel de 2-iodobenzoate issue de la réaction. Cette méthode est utilisable avec différents thiols et alcynes aliphatique pour donner de bons rendements.

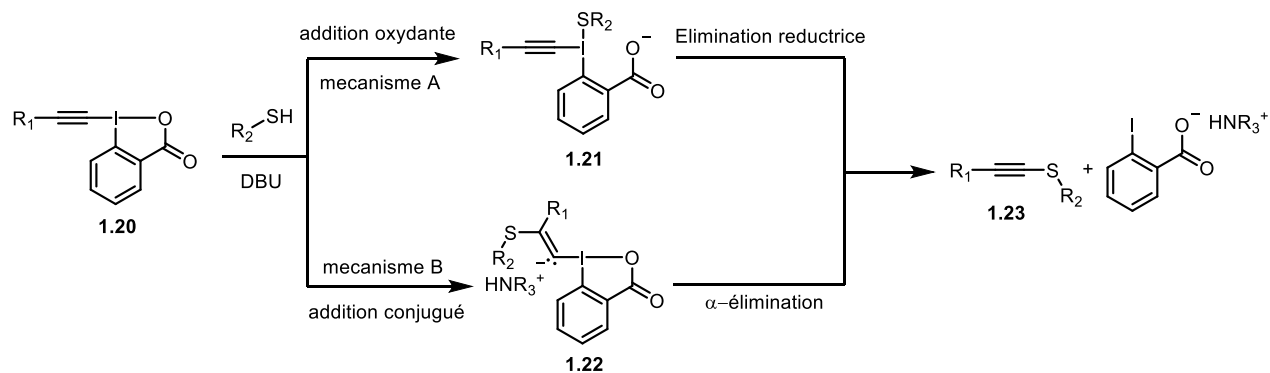


Figure 11. – Mécanisme de réaction de la formation d'un thioalcyne

#### 1.5.4 Synthèse catalytique par cuivre (I)

Dr. Santandrea, un ancien membre du groupe est parvenu à mettre au point une méthode de synthèse catalytique utilisant comme système catalyseur  $\text{Cu}(\text{MeCN})_4\text{PF}_6/\text{dtbbpy}$  pour former des thioalcynes par couplage croisé entre un bromure d'alcyne **1.24** et un thiol **1.25**<sup>[30]</sup>. Il suppose que le mécanisme de la réaction se passe comme dans la figure 11 présentée ci-dessous. Le complexe **1.26** formé in situ dans le milieu réactionnel, en présence d'une base et du thiol, forme l'intermédiaire **1.27**. S'en suit alors une addition oxydante du bromure d'alcyne sur l'intermédiaire **1.22** pour donner le Cu(III) pentacoordonné **1.28**. L'élimination réductrice de ce dernier donne alors le thioalcyne **1.23** et le catalyseur régénéré **1.29**. Des mécanismes alternatifs envisagent l'addition du cuivre et du thiol sur l'alcyne. Deux cas sont alors envisageables selon la régiosélectivité de la réaction donnant alors les deux intermédiaires possibles **1.28'** et **1.28''**. L'intermédiaire **1.28'** subirait alors une élimination de type E2 pour donner le thioalcyne désiré alors que dans le cas de l'intermédiaire **1.28''**, une α-élimination donne le thiol avec le catalyseur régénéré. Le mécanisme est actuellement étudié de manière computationnelle par Mr. Mathieu Morency en collaboration avec Pr. Iftimie à l'université de Montréal.

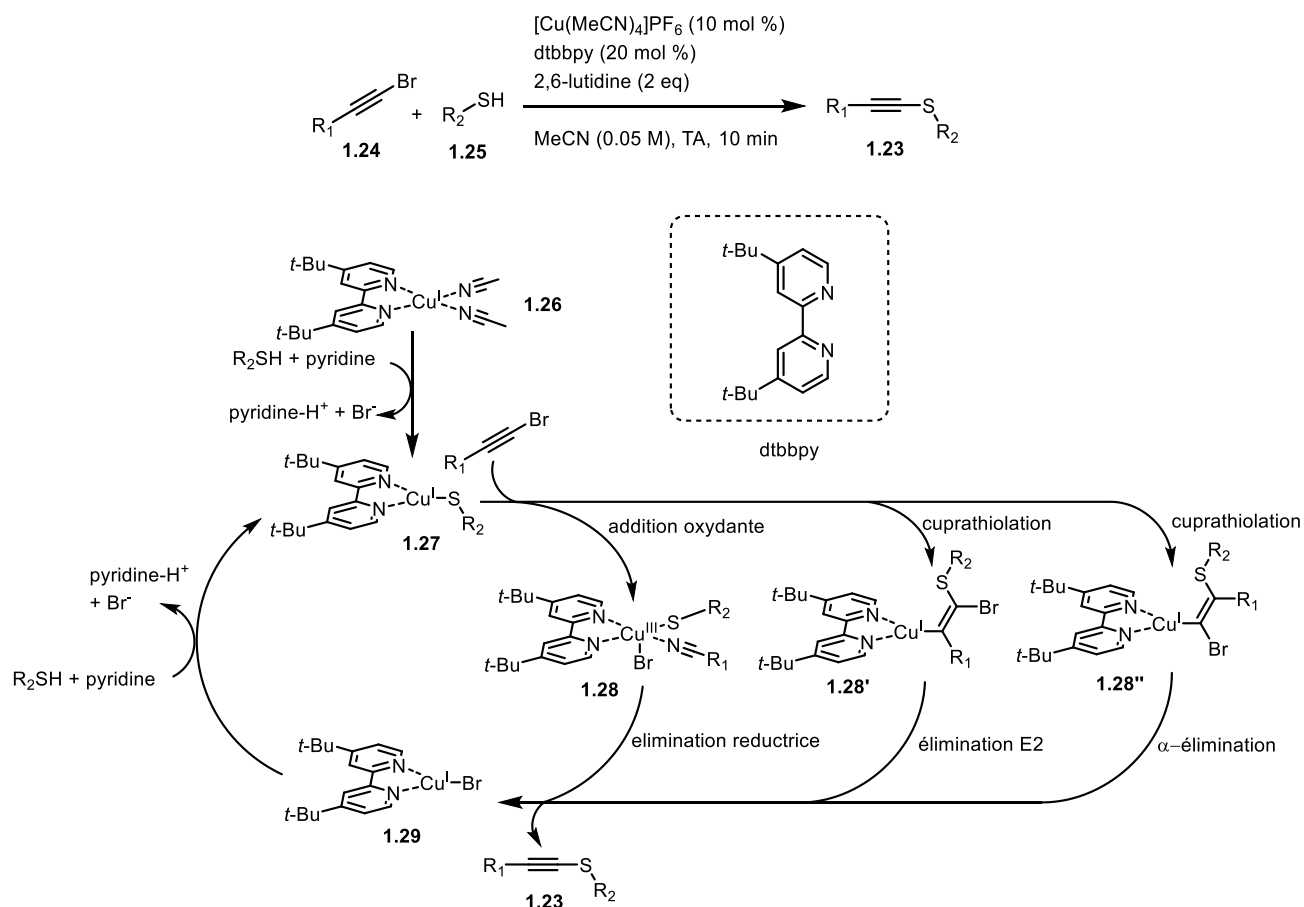
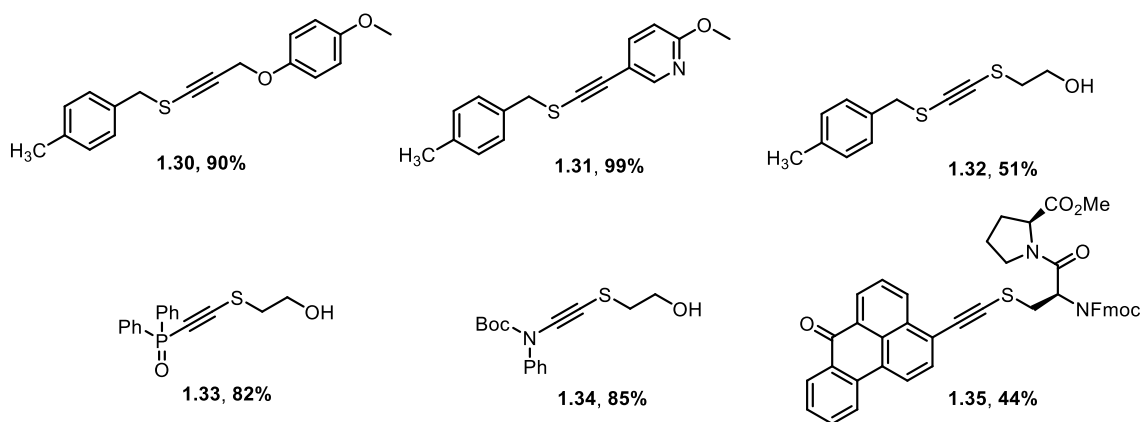


Figure 12. – Synthèse catalytique de thioalcynes par couplage croisé et mécanismes de réaction plausible

La synthèse de thioalcyne par couplage croisé a été utilisée pour la synthèse de 42 thioalcynes avec des rendements allant de 35% à 99% (tableau 1). Cette méthode est applicable sur un grand nombre de thiols et de bromures d'alcynes, aliphatiques comme aromatiques (tableau 1, **1.30** et **1.31**). Il a également été possible de former des alcynes bisubstitués *S-S* (tableau 1, **1.32**), *S-P* (tableau 1, **1.33**) et *S-N* (tableau 1, **1.34**) peu communs et montre par conséquent que cette méthode de synthèse ouvre de nouvelles possibilités de synthèse. Enfin, la méthode de synthèse a pu être appliquée avec succès pour le marquage de cystéine (tableau 1, **1.35**). Ce dernier point nous a motivés pour utiliser cette méthode pour la synthèse de macrocycles peptidiques incluant des thioalcynes comme connecteur.

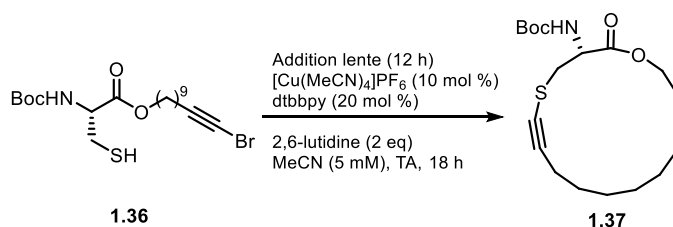
Tableau 1. – Exemples de thioalcyne synthétisés par couplage croisé entre un bromure d'alcyne et un thiol



## 1.6 Synthèse de macrocycle dérivé de la cystéine

La réaction de couplage croisé pour la synthèse de thioalcyne a donc le potentiel d'être utilisable pour des réactions de macrocyclisation. D'autres stratégies de synthèse de thioalcyne comme l'utilisation d'iode hypervalent ne serait pas suffisamment tolérante et risque d'interagir avec d'autres fonctions du précurseur. D'autres méthodes catalytiques existent, mais sont limitées aux alcynes de phényle<sup>[31]</sup> alors que la majorité des réactions de macrocyclisation se fait entre des chaînes aliphatiques<sup>[5]</sup>. Après avoir optimisé la réaction de couplage  $C_{sp}-S$ , l'investigation s'est poursuivie par la tentative de synthèse de macrocycle peptidique. Éric Godin, un autre membre du groupe a appliqué ces conditions pour la macrocyclisation du précurseur **1.36** (tableau 2). Cependant, il aura été nécessaire de faire la réaction à basse concentration et ajouter le précurseur par addition lente pour donner le macrocycle **1.37** avec 56% de rendement<sup>[32]</sup>. Des tentatives d'optimisation comme diminuer de concentration ou augmenter la quantité de catalyseur se sont conclues par une baisse de rendement. La diminution du temps de l'addition lente ainsi que la tentative de faire la réaction sans addition lente s'est également conclu par une baisse de rendements.

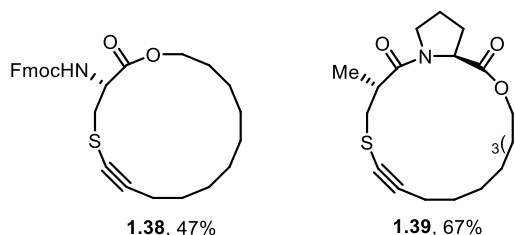
Tableau 2. – Optimisation pour la macrocyclisation par formation d'un thioalcyne



| Entrée | Changements                   | Rendement (%) |
|--------|-------------------------------|---------------|
| 1      | Aucun                         | 56            |
| 2      | [2.5 mM]                      | 38            |
| 3      | Quantité catalytique doublée  | 29            |
| 4      | Addition lente (2h), [2.5 mM] | 41            |
| 5      | Pas d'addition lente          | 34            |

Après avoir optimisé les conditions de macrocyclisation, la méthode de synthèse a été appliquée à différents précurseurs (tableau 3). Il a été montré qu'il est possible de remplacer le groupe protecteur Boc par Fmoc pour donner le macrocycle **1.38** avec 47% de rendement. Il a également été possible de former avec 67% de rendement le macrocycle **1.39** à partir du captopril, un dérivé de la cystéine utilisée en médecine contre l'hypertension artérielle<sup>[33]</sup>. La formation de macrocycle via le couplage croisé entre un bromure d'alcyne et le thiol d'une cystéine est donc possible avec cette méthode de couplage croisé. L'interrogation se pose donc s'il est possible d'ajouter plus d'acide aminé avec cette méthode.

Tableau 3. – Différents macrocycles produits par couplage croisé entre un thiol et un bromure d'alcyne



Nous avons donc porté un grand intérêt pour les macrocycles tripeptidiques pour leurs propriétés biologiques. Comme pour les macrocycles dipeptidiques, les macrocycles tripeptidiques sont intrigant pour la recherche et le développement de composé biologiquement actif. Leurs masses molaires peu élevé par rapport à d'autre macromolécule amène une synthèse moins couteuse, la possibilité d'une administration par voie oral mais également une analyse de la structure et de l'activité biologique plus simple à mettre en place<sup>[34]</sup>. Leurs synthèses peut cependant être difficile du a la conformation des amides qui est n'est pas favorable pour la macrocyclisation<sup>[35]</sup>. L'utilisation de la méthode de synthèse de thioalcyne catalysée au cuivre permettra donc non seulement de faciliter la synthèse de macrocycle, mais également ouvrir la voie a la synthèse de peptides rigides intéressant dans la recherche de composés médicaux.

## 1.7 Objectifs de projet

Nous avons donc 2 principaux objectifs pour ce projet :

- 1) Mettre en place une stratégie de synthèse pour la production de précurseur tripeptidique utilisable pour le couplage croise de thiols avec des bromures d'alcynes afin de former des macrocycles tripeptidiques. La stratégie doit pouvoir se faire dans des conditions de réaction douce et doit demander des composés commercialement disponibles ou facilement synthétisables. Il est également important que cette stratégie soit capable d'incorporer différents acides aminés dans le tripeptide pour rendre la méthode de synthèse versatile.
- 2) Utiliser ces précurseurs tripeptidiques pour la réaction de couplage afin d'investiguer la possibilité de former des macrocycles tripeptidiques via le couplage croisé entre un thiol et un bromure d'alcyne. Des optimisations seront faites au besoin et les macrocycles formés seront ensuite soumis à des tentatives de diversification afin de démontrer l'avantage des thioalcynes comme lien de macrocyclisation.

## **Chapitre 2. Synthèse de macrocycle tripeptidique par la formation d'un thioalcyne**

### **2.1 Développement d'une retrosynthèse pour les macrocycles tripeptidiques**

Le but de la recherche étant d'investiguer la formation de macrocycle tripeptidique via le couplage croisé de thiols et de bromures d'alcyne. Une étape importante est de développer une rétrosynthèse pour le macrocycle désiré (figure 12). Sachant qu'un thiol est demandé pour le couplage croisé, nous décidons d'inclure la cystéine (encadré en rouge figure 12). Le deuxième acide aminé peut ensuite être facilement changé (encadré en vert figure 12). Le troisième acide aminé doit être fonctionnalisé avec un bromure d'alcyne. Le bromure d'alcyne devra être lié en utilisant la chaîne latérale de l'acide aminé, ou sa fonction acide carboxylique. Nous choisissons la deuxième option, sachant que ça permet d'incorporer de nombreux acides aminés différents, tous attachés par leur acide carboxylique respectif. Assembler le tripeptide linéaire pour la cyclisation peut se faire dans deux différentes directions. Soit la synthèse peut commencer avec le troisième acide aminé possédant la chaîne possédant le bromure d'alcyne et faire l'assemblage jusqu'à la cystéine, soit la synthèse peut commencer avec une cystéine protégée commercialement disponible et faire l'assemblage jusqu'au troisième acide aminé couplé à la chaîne possédant le bromure d'alcyne. Notre étude initiale est de commencer par le couplage peptidique du deuxième acide aminé avec une cystéine protégée.



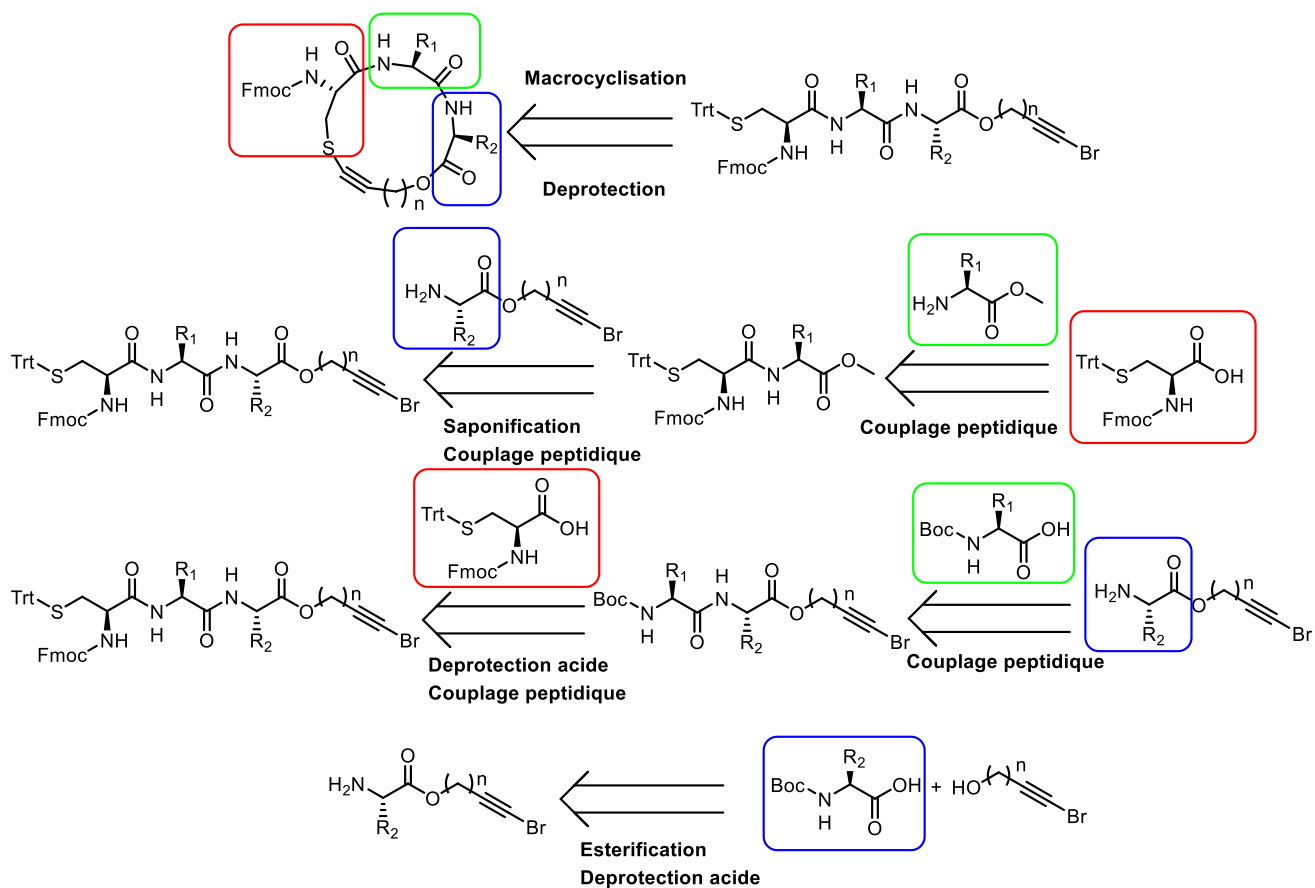


Figure 13. – Rétrosynthèse d'un macrocycle tripeptidique possédant un thioalcyne et les deux méthodes possibles pour la synthèse peptidique

La retrosynthèse présentée dans la figure 12 indique que le couplage peptidique entre la cystéine et un acide aminé estérifier suivit de la saponification de l'ester. Parallèlement, le troisième acide aminé protégé par un groupe protecteur *tert*-butoxycarbonyl (Boc) est couplé par estérification à une chaîne possédant un bromure d'alcyne terminal. Ce dernier est ensuite déprotégé et couplé au dipeptide produit précédemment pour donner le tripeptide. La déprotection du thiol (protégé par un groupe trityl) et la synthèse du thioalcyne nous donnent finalement le macrocycle désiré.

## 2.2 Développement d'une stratégie de synthèse de macrocycle tripeptidique possédant un thioalcyne

La synthèse du tripeptide débute par le couplage peptidique montré dans le schéma 6. Le *N*-Fmoc-*S*-trityl-cystéine **2.1** et la *L*-leucinate **2.2** de méthyle pour donner le dipeptide **2.3** sous la forme d'un solide blanc avec 81% de rendement. Pour faire le couplage, nous utilisons comme

agent de couplage le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC). Afin d'éviter l'épimérisation des acides aminés, nous ajoutons du hydroxybenzotriazole (HOBt) comme additif au mélange réactionnel. Le dipeptide **2.3** étant un ester, une saponification par LiOH dans le THF est faite pour donner le dipeptide **2.4** avec 48% de rendement.

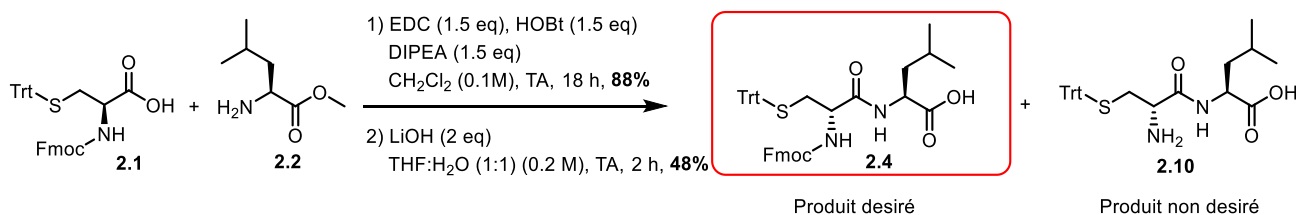


Schéma 7. – Couplage peptidique de la cystéine **2.1** et la leucine **2.2** et déprotection par saponification du dipeptide **2.3**

La synthèse du deuxième fragment **2.9** est montrée dans le schéma 7. Le pentyne-1-ol **2.5** est brominé avec NBS donnant le bromure d'alcyne **2.6** sous la forme d'une huile jaune avec 20% de rendement. En parallèle, l'amine de *L*-phénylalanine **2.7** est protégée sous la forme d'un Boc pour donner **2.8** sous la forme d'une huile incolore avec 81% de rendement. L'acide aminé **2.8** et le bromure d'alcyne **2.7** sont finalement couplés par estérification en présence de EDC/HOBt donnant le dipeptide désiré **2.9** avec 25% de rendement.

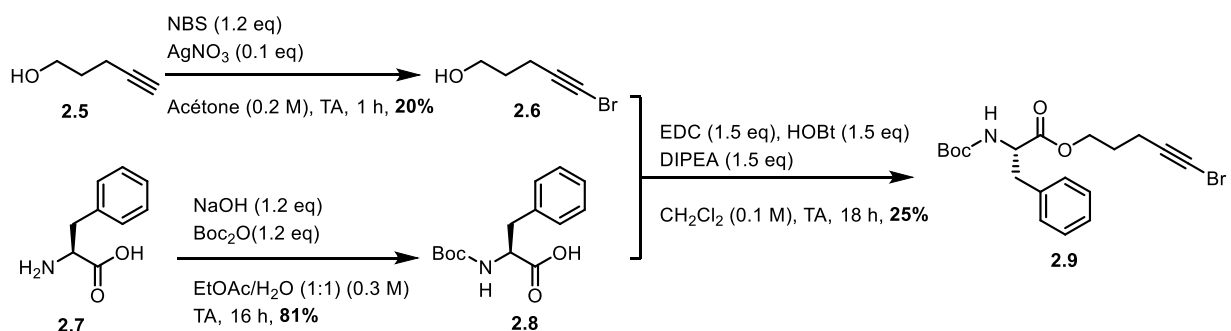


Schéma 8. – Bromination de l'alcyne terminal **2.5** et estérification avec acide aminé **2.8**

Dès le début de la route synthétique, deux aspects s'avèrent être problématiques. Premièrement, le rendement saponification du dipeptide **2.3** est peu élevé donnant 48%. La saponification du dipeptide **2.3** donne en effet un mélange d'acide aminé **2.4** et d'acide aminé déprotégé **2.10**. La formation de l'acide aminé non désiré **2.10** est une réaction secondaire ou Fmoc est clivé par le

LiOH en milieu basique. Deuxièmement, la bromination du 4-pentyne-1-ol **2.5** donne des rendements faibles de 20% et s'avère également difficile à isoler, la formation de l'acide aminé **2.9** donne également un rendement faible de 25%.

En synthèse totale, il est important d'avoir chaque étape avec les meilleurs rendements possible. Par conséquent, nous avons décidé de ne pas continuer la première stratégie de synthèse et d'apporter des modifications aux premières étapes afin d'obtenir de meilleurs rendements. Premièrement, la *N*-Fmoc-*S*-trityl-cystéine a été remplacée par la *N*-Boc-*S*-trityl-cystéine **2.11** pour éviter une déprotection de la fonction amine de ce dernier. La réaction montrée sur le schéma 8 débute avec le couplage peptidique de *N*-Boc-*S*-trityl-cystéine **2.11** avec la *L*-leucinate de méthyle **2.2** qui donne 38% de rendement. Ce dernier est suivi par la saponification du dipeptide **2.12** avec LiOH qui donne l'acide libre **2.13** avec 90% de rendement.

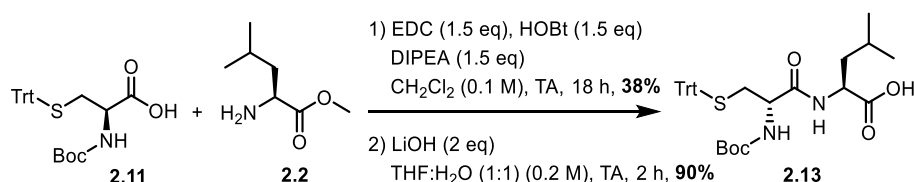


Schéma 9. – Couplage peptidique de la cystéine **2.11** et la *N*-Boc-*L*-leucine **2.2** et déprotection par saponification pour l'obtention du dipeptide **2.13**

Des changements ont également été apportés pour la synthèse du fragment **2.9**. Comme montré sur le schéma 9, le 4-pentyne-1-ol **2.5** a été remplacé par l'acide 5-hexynoïque **2.14**, sa bromination au NBS donne le bromure d'alcyne **2.15** avec 98% de rendement. Avec le changement précédent, il est nécessaire que l'acide aminé avec qui il sera couplé possède un groupement alcool sur sa chaîne latérale. La *L*-serinate d'éthyle **2.16** a donc été protégé par Boc<sub>2</sub>O pour donner l'acide aminé protégé **2.17** avec 76% de rendement. Le couplage de l'acide aminé **2.17** et du bromure d'alcyne **2.15** par estérification avec EDC/HOBt donne l'acide aminé **2.18** avec 73% de rendement.

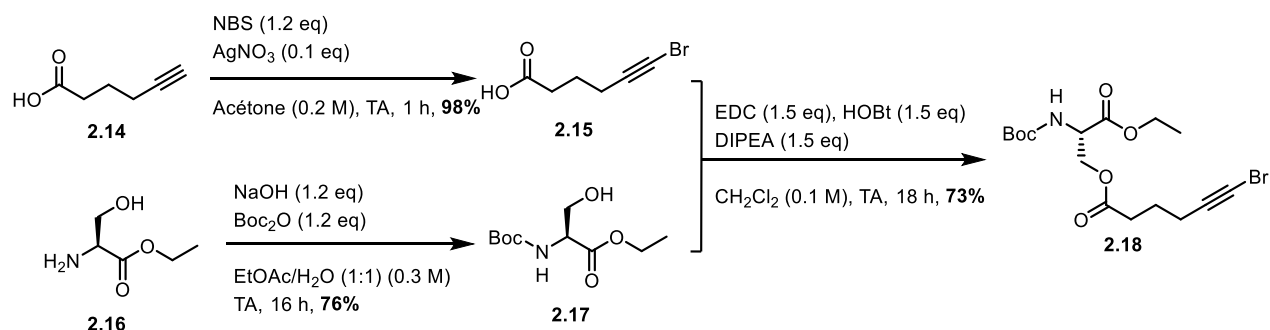
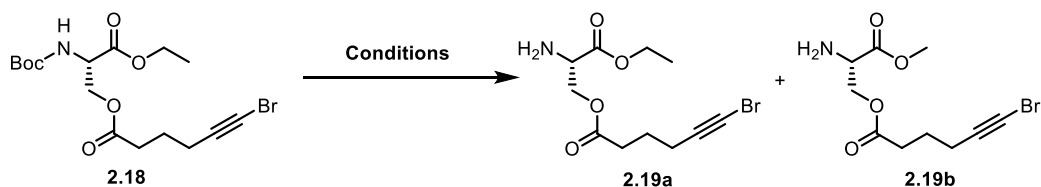


Schéma 10. – Bromination de l'alcyne terminal **2.15** et estérification avec acide aminé **2.17**

La prochaine étape de la synthèse est la déprotection du groupement Boc de l'acide aminé **2.18**. La déprotection de l'acide aminé **2.18** s'est faite avec le chlorure d'acyle dans le méthanol (tableau 4). Cependant, cette dernière réaction s'est accompagnée d'une réaction secondaire de transestérification avec le méthanol, donnant l'acide aminé méthylé **2.19b** non désirable en produit majoritaire. Pour éviter la transestérification de l'acide aminé protégé **2.18**, la réaction de déprotection a été refaite dans l'éthanol à la place de l'éthanol, mais cela s'est conclu par la non-présence de l'espèce désirée **2.19a** et la récupération de l'acide aminé protégé **2.18**. La déprotection de **2.18** s'est fait sur le TFA dans le DCM donnant l'acide aminé **2.19** avec 66% de rendement.

Tableau 4. – Déprotection acide de l'acide aminé **2.18**



| Entrée | Conditions  | Rendements (%) |     |
|--------|---|----------------|-----|
|        |   | 19a            | 19b |
| 1      | AcCl, MeOH, (0.2 M), 18 h                         | 20             | 80  |
| 2      | AcCl, EtOH, (0.2 M), 18 h                         | 0              | 0   |
| 3      | TFA, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (0.1 M), 1 h | 66             | 0   |

Une fois le dipeptide **2.13** et l'acide aminé **2.19** obtenue, il était désormais possible d'obtenir le tripeptide via un dernier couplage peptidique. Comme montré sur le schéma 10, le couplage s'est fait, comme pour la formation du dipeptide **2.12**, avec l'utilisation de EDC/HOBt comme agent de couplage pour donner le tripeptide **2.20** avec 67% de rendement. Nous obtenons cependant un mélange de diastéréoisomères. L'origine de ces diastéréoisomère viendrait du milieu basique durant la saponification qui favorise l'épimérisation du dipeptide **2.13**.

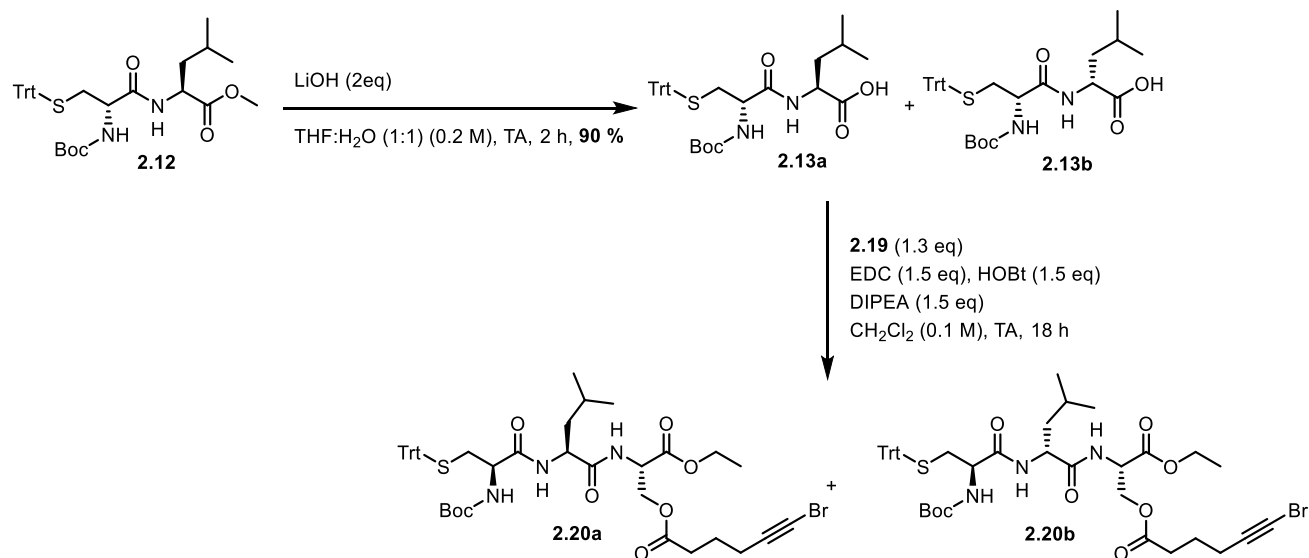


Schéma 11. – Synthèse du tripeptide **2.20** par couplage peptidique

Il n'est donc pas possible de former le tripeptide diastéréopure en commençant par la cystéine **2.11**. Nous décidons alors de faire la synthèse peptidique à partir du troisième acide aminé possédant le bromure d'alcyne. Comme montré dans le schéma 11, l'acide aminé **2.19** a été couplé à la Boc-L-leucine **2.21** pour donner le dipeptide **2.22** avec 66% de rendement. Ce dernier est ensuite déprotégé au TFA pour donner le dipeptide **2.23** avec 98% de rendement. Le troisième couplage peptidique avec N-Boc-S-trityl-cystéine **2.11** donne alors le tripeptide diastéréopure **2.20** avec 64% de rendement sous la forme d'un solide blanc.

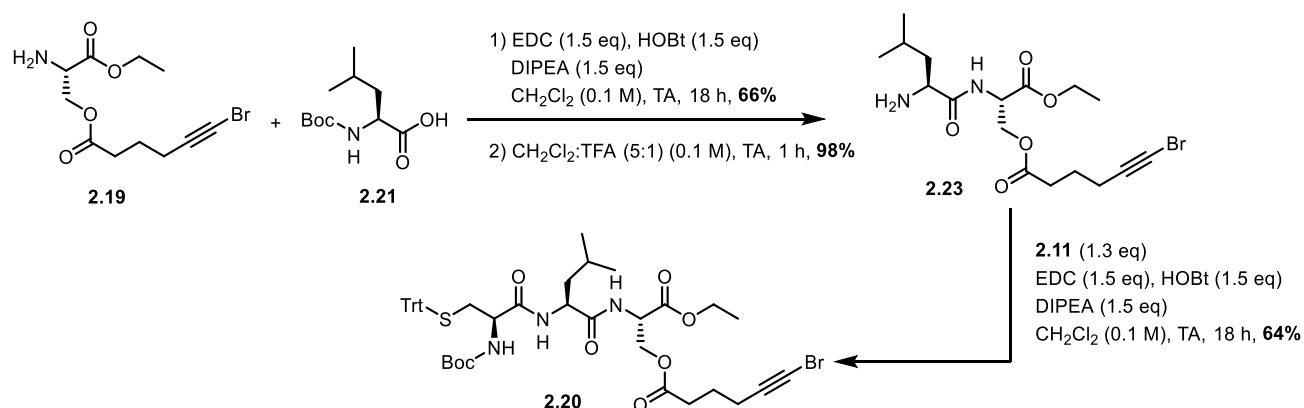


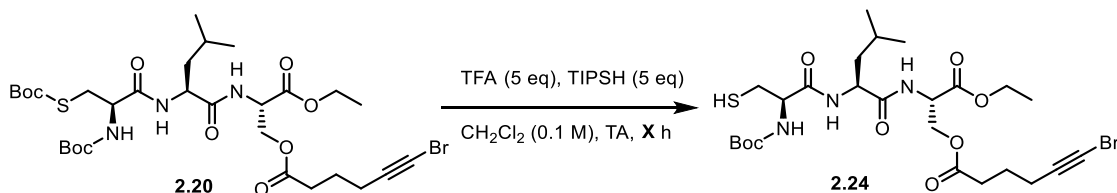
Schéma 12. – Synthèse du tripeptide **2.20** par couplage peptidique

Nous avons mis au point une méthode de synthèse pour la formation de tripeptides utilisables pour la synthèse de macrocycle tripeptidique via le couplage croisé entre un bromure d'alcyne et un thiol. Le prochain objectif est donc de voir si la macrocyclisation se fera avec le tripeptide **2.20**. Il est également envisagé d'étudier la versatilité de cette méthode en faisant varier les acides aminés pour étudier leur influence sur la formation du tripeptide et du macrocycle.

### 2.3 Macrocyclisation de tripeptide par formation d'un thioalcyne

Nous avons synthétisé un tripeptide **2.20** utilisable pour le couplage croisé entre un bromure d'alcyne et un thiol pour l'obtention d'un thioalcyne. La prochaine étape est alors de libérer le thiol de son groupement protecteur trityl afin de donner le tripeptide déprotégé **2.24** montré dans le tableau 5. Cette déprotection se fait en présence de TFA et de triisopropylesilane (TIPSH) dans le DCM anhydre pendant 4h. Malgré une réaction arrivée à complétion, la présence du tripeptide désiré **2.24** n'est pas observée. Il est fort probable qu'une partie du réactif de départ **2.20** ait perdu son groupe protecteur Boc. Le suivi de la réaction par chromatographie sur couche mince dévoilait en effet des composés uniquement en ligne de base, montrant donc la présence de composés polaires, comme une amine libre. En réduisant le temps de réaction à deux heures, nous avons obtenu le tripeptide **2.24** avec 85% de rendement.

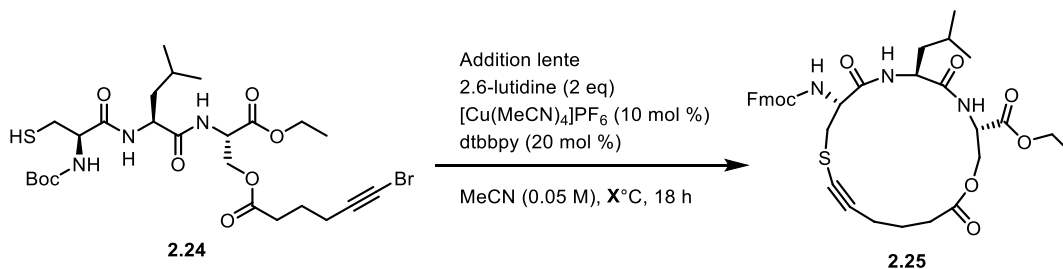
Tableau 5. – Rendement de la déprotection du tripeptide **2.20** selon le temps de réaction



| Entrée | X (h) | Rendement (%) |
|--------|-------|---------------|
| 1      | 4h    | 0             |
| 2      | 2h    | 85            |

Le tableau 6 montre la macrocyclisation du tripeptide **2.24** via la formation du thioalcyne avec les deux extrémités du tripeptide **2.24**. Le catalyseur de cuivre est formé in situ dans le ballon réactionnel dans l'acétonitrile sous azote. Il est important de ne pas avoir d'oxygène dans le milieu réactionnel, car l'oxygène encourage la formation de disulfide. Le tripeptide **2.24** est ajouté par addition lente avec un presse seringue pendant 12h à température ambiante. Le macrocycle à 17 atomes **2.25** est finalement obtenu après purification avec un rendement de 55%. La réaction a été reproduite à 70°C, donnant un rendement plus bas de 30%.

Tableau 6. – Rendements de la macrocyclisation du tripeptide **2.24** selon la température



| Entrée | Température (°C)     | Rendement (%) |
|--------|----------------------|---------------|
| 1      | Température ambiante | 55            |
| 2      | 70                   | 30            |

Nous confirmons par le biais de la formation du macrocycle **2.25** qu'il est possible de synthétiser des macrocycles tripeptidiques grâce à la formation d'un thioalcyne par couplage croisé. Le

prochain objectif est d'investiguer la portée de cette stratégie de synthèse. Avec cette méthode, le seul acide aminé qu'il est possible de changer est le deuxième acide aminé (en vert, figure 12). Nous présentons par conséquent, 3 macrocycles supplémentaires dont la différence est le deuxième acide aminé. Le schéma 12 montre le couplage peptidique de l'acide aminé **2.19** par le Boc-*L*-phénylalanine **2.8** à la place de la Boc-*L*-leucine **2.21** pour donner le dipeptide **2.26** avec 49% de rendement. Avec ce changement d'acide aminé, on remarque déjà une baisse de rendement par rapport à la synthèse du dipeptide **2.22** qui donnait 66%. La déprotection du dipeptide **2.26** se fait comme pour la déprotection du dipeptide **2.22** au TFA pour donner le dipeptide **2.27** avec 98% de rendement sous la forme d'une huile jaune.

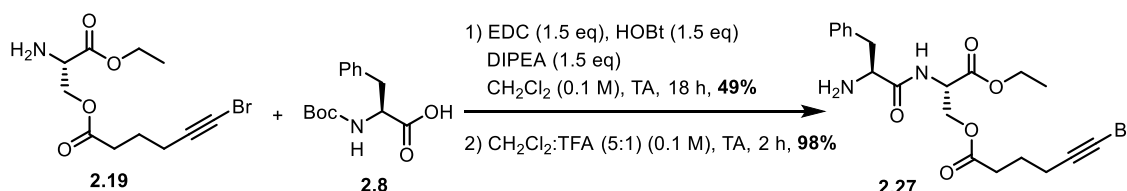


Schéma 13. – Couplage de l'acide aminé **2.19** avec *N*-Boc-*L*-phénylalanine et déprotection par action du TFA

Le schéma 13 montre la suite de la synthèse avec le couplage peptidique du dipeptide **2.27** avec la *S*-trityl-*N*-Boc-cystéine **2.11** par réaction d'amidation au EDC/HOBt pour donner le tripeptide **2.28** avec 68% de rendement sous la forme d'un solide blanc. La synthèse du tripeptide **2.28** a donc globalement donné un rendement moins bon que pour le tripeptide **2.20**. La synthèse du tripeptide **2.28** donne un rendement global de 11%, contre un rendement global de 15 % pour la synthèse du tripeptide **2.20**. Comme montré sur le schéma 13, la déprotection du tripeptide **2.28** a également donner un moins bon rendement que pour le tripeptide **2.20**, donnant le thiol **2.29** avec 47% de rendement.

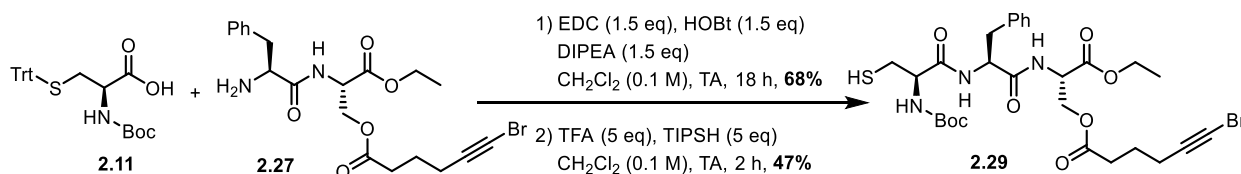


Schéma 14. – Synthèse du tripeptide **2.29** par couplage peptidique et la déprotection du thiol



Finalement, la macrocyclisation du tripeptide **2.29** via couplage croisé montré dans le schéma 14 donne le macrocycle **2.30** avec 30% de rendement, soit, un moins bon rendement que pour la synthèse du macrocycle **2.25**. En conclusion, remplacer la *L*-leucine par la *L*-phénylalanine dans le tripeptide semble faire diminuer rendement pour la synthèse de tripeptides ainsi que pour la réaction de macrocyclisation.

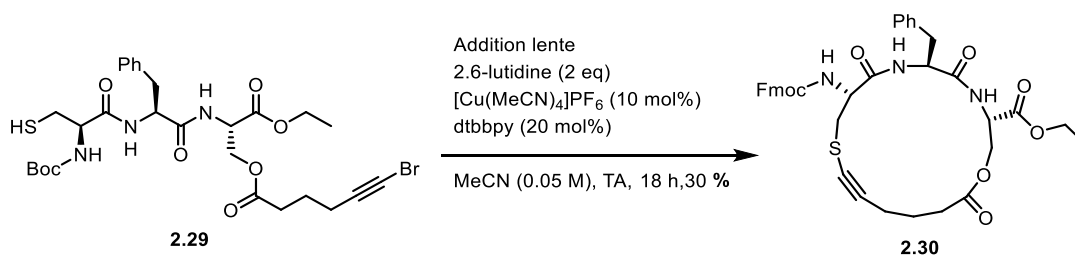


Schéma 15. – Synthèse du macrocycle **2.30** par couplage croisé entre le thiol et le bromure d'alcyne du tripeptide **2.29**

## 2.4 Inclusion du tryptophane dans le macrocycle

L'indole est une fonction chimique présente dans un grand nombre de composés biologiquement actifs utilisés dans différentes industries<sup>[36]</sup> (figure 13). Grâce au tryptophane, il est possible d'inclure une fonction indole dans des peptides et des macrocycles peptidiques. Ces deux facteurs nous ont motivés d'utiliser notre méthode de synthèse avec un tryptophane pour inclure un indole dans notre macrocycle.

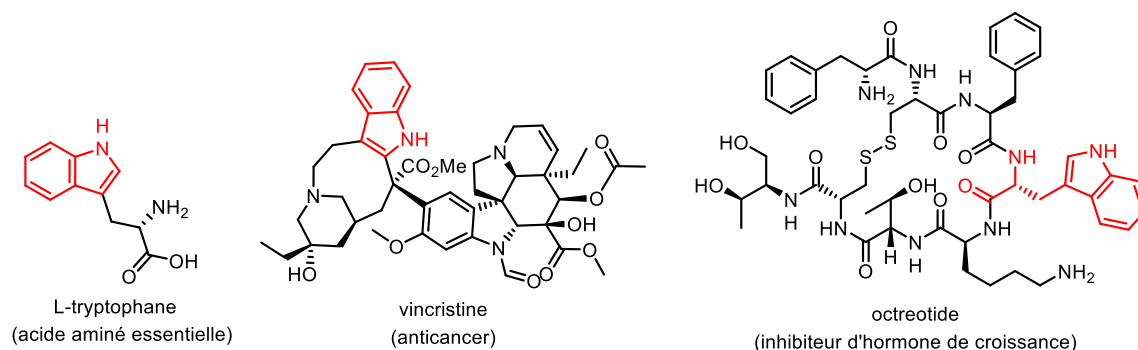


Figure 14. – Structure du *L*-tryptophane et exemple de composés médicaux possédant un indole ou un tryptophane (en rouge)

Le schéma 15 montre le couplage de l'acide aminé **2.19** avec le 1-Boc-*N*-Fmoc-*L*-tryptophane **2.31** pour donner le dipeptide **2.32** avec 60% de rendement. Ce dernier étant protégé par un groupement Fmoc, la déprotection a été faite par la pipéridine dans le DCM anhydre. Bien que la réaction arrive à complétion, la présence du dipeptide **2.33** n'a pas été observée, seul le groupe protecteur Fmoc résiduel **2.34** a été observé. Par conséquent la tentative de synthétiser ce macrocycle a vite été abandonner.

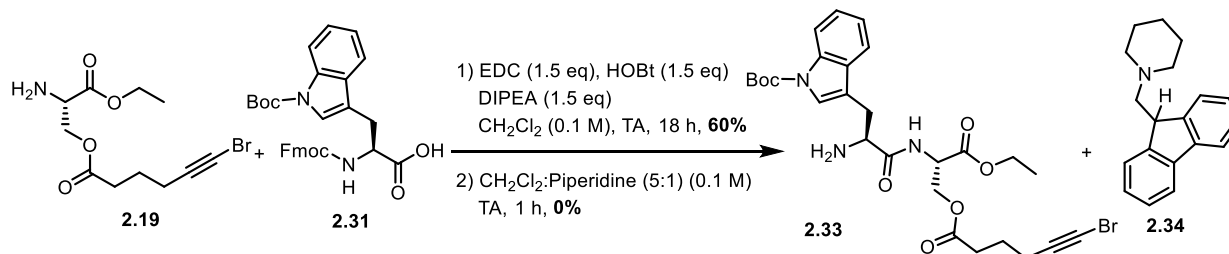
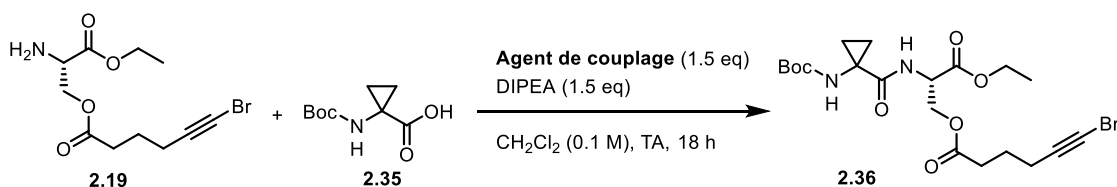


Schéma 16. — Couplage de l'acide aminé **2.19** avec tryptophane et déprotection du groupement Fmoc

## 2.5 Inclusion d'un acide aminé quaternaire dans le macrocycle

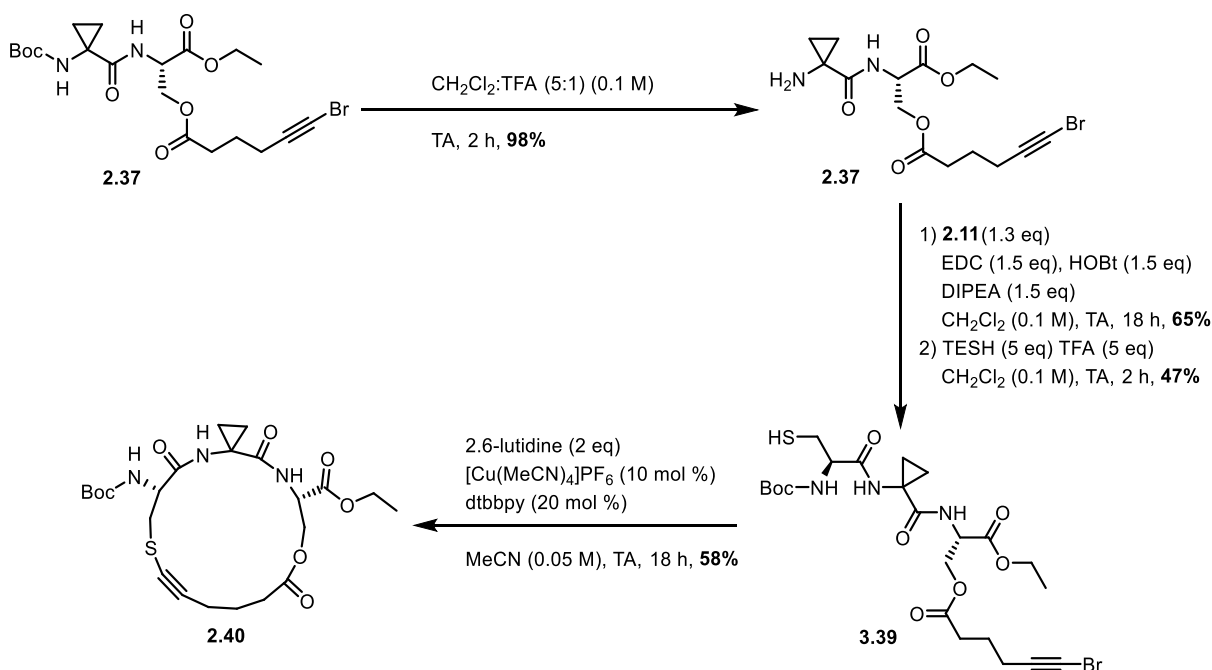
L'acide cyclopropanecarboxylique (Acc) est un produit naturel abondant et connu pour ses propriétés antifongiques<sup>[37]</sup> et potentiellement antidépresseurs<sup>[38]</sup>. Sa structure est également plus rigide dû à son carbone quaternaire<sup>[39]</sup>. De plus le groupement cyclopropyle est devenu un groupement d'intérêt dans le développement de produit pharmaceutique, principalement dû à sa tendance à amplifier l'activité biologique de certains composés bioactif<sup>[40]</sup>. Le couplage de l'acide aminé **2.19** avec Acc **2.35** est montré dans le tableau 7. Acc n'étant pas chiral, la présence d'HOBt n'est pas nécessaire. Nous avons quand même fait le couplage de **2.19** avec Acc avec l'agent de couplage HATU. Le couplage peptidique (tableau 7) donne le dipeptide **2.36** avec 94%, mais étrangement, nous n'avons pas été capables de répéter la réaction. Nous sommes donc restés sur le couple EDC/HOBt qui malgré de moins bons rendements, était plus fiable. On arrive finalement à obtenir le dipeptide **2.36** avec 66% de rendement.

Tableau 7. – Rendement du couplage peptidique de l'acide aminé **2.19** avec Acc **2.35** selon l'agent de couplage



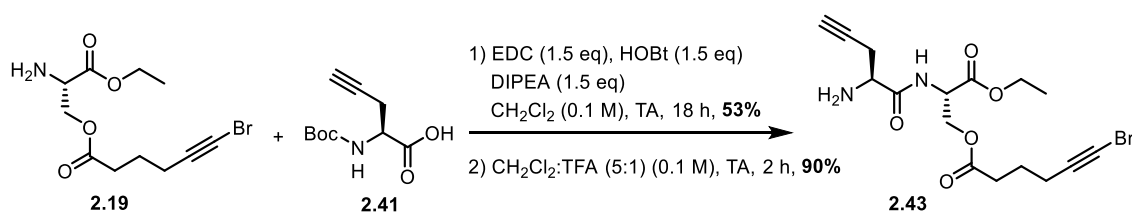
| Entrée | Agent de couplage | Rendement (%) |
|--------|-------------------|---------------|
| 1      | HATU              | 94            |
| 2      | EDC/HOBt          | 66            |

La synthèse du macrocycle **2.40** montré dans le schéma 16 continue avec la déprotection du dipeptide **2.36** qui donne un excellent rendement avec 98%. Ce dernier a été coupler à *S*-trityl-*N*-Boc-cystéine **2.11** donnant le tripeptide **2.38** avec 65% de rendement sous la forme d'un solide blanc. Pour le clivage du groupe protecteur trityl du tripeptide **2.38**, ce dernier a été traité avec triethylsilane (TESH) et TFA dans le DCM anhydre pendant 2h. la réaction a ensuite été arrêtée avec DIPEA donnant le tripeptide **2.39** avec 47% de rendement après isolation. La macrocyclisation a été faite avec les mêmes conditions que pour les macrocycles **2.25** et **2.30**, donnant un rendement très correct de 58%. En comparant les rendements de synthèse du macrocycle à 17 atomes **2.40** avec celui du macrocycle à 17 atomes **2.25** (possédant leucine en 2<sup>ème</sup> acide aminé), on peut remarquer qu'ils sont très similaires. Le rendement de la synthèse du macrocycle **2.40** pourrait être expliqué par l'effet Thorpe-Ingold ou gem-diméthyle. Cette effet démontre que la présence de deux groupements méthyle sur un même carbone influence l'orientation des liaisons adjacentes <sup>[41]</sup>. Cela amène alors à une conformation éclipsée au lieu d'une conformation normalement décalée, ce qui facilite les réactions de cyclisation. Si cet effet est efficace pour la formation de petits cycles<sup>[42]</sup>, il est cependant peu influent pour la formation de grands cycles<sup>[43]</sup>.



## 2.6 Inclusion du propargyle glycine dans le macrocycle

Durant notre investigation sur la versatilité de notre stratégie de synthèse, nous nous sommes intéressés à l'inclusion du propargyle glycine dans le tripeptide. Nous avons expliqué précédemment (introduction) l'avantage d'avoir un thioalcyne dans la structure d'un macrocycle, permettant de diversifier le macrocycle via plusieurs réactions possibles sur le thioalcyne. La présence d'un deuxième alcyne dans le macrocycle permet d'ouvrir encore plus de possibilités de fonctionnalisation du macrocycle pour donner des molécules plus complexes. Cette expérience montre également la chimiosélectivité de la réaction de couplage croisé entre le thiol et le bromure d'alcyne.



La synthèse du tripeptide **2.44** débute avec le couplage montré dans le schéma 17. Le couplage de l'acide aminé **2.19** avec le propargyle glycine **2.41** donne un rendement de 53%. La réaction est suivie d'une réaction de déprotection avec TFA pour donner l'acide aminé **2.43** avec 90% de rendement. La suite de la synthèse est montrée dans le schéma 18. Le dipeptide **2.43** est utilisé pour le couplage avec le *N*-Boc-*S*-trityl-cysteine **2.11** pour donner le tripeptide **2.44** avec 59% de rendement. Le clivage du groupe protecteur trityl du tripeptide **2.44** s'est fait avec TESH et TFA pour donner le tripeptide **2.45** avec 42% de rendement. Enfin, le tripeptide **2.45** est soumis à la réaction de macrocyclisation par couplage croisé pour donner le macrocycle **2.46** avec 30% de rendement.

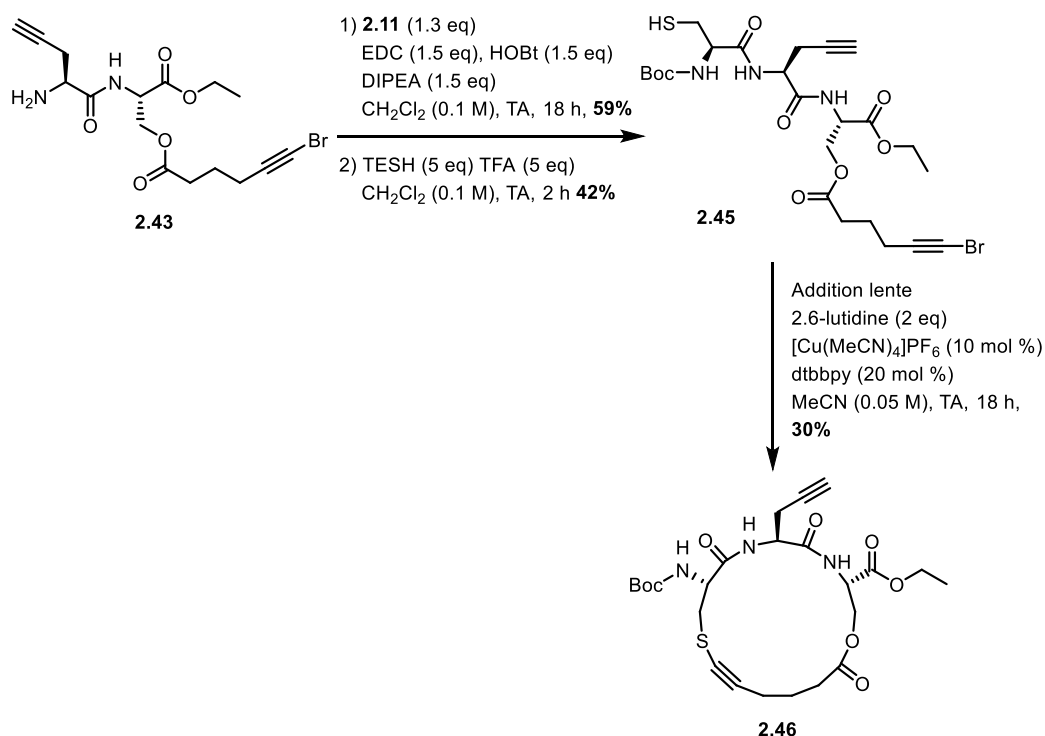


Schéma 19. — Synthèse du macrocycle **2.46** possédant propargyle glycine

Avec l'obtention du macrocycle **2.46**, un objectif du groupe était de montrer les possibilités de fonctionnalisation des thioalcyne des macrocycles pour obtenir des macrocycles plus complexes. De plus, il est intéressant de voir s'il est possible de travailler sur les deux alcyne du macrocycle **2.46** de manière orthogonale, ouvrant ainsi encore plus de possibilités pour la fonctionnalisation des macrocycles. Le schéma 19 montre la fonctionnalisation orthogonale du macrocycle **2.46** faite

par Javier Guerrero, un autre étudiant du groupe. Ce dernier a été capable d'utiliser le macrocycle **2.46** pour la cycloaddition sur l'alcyne terminal du propargyle glycine avec un azoture de farnésyl via une réaction « click » dirigé par un catalyseur de cuivre (CuAAC) sans affecter le thioalcyne, donnant le macrocycle **2.47** avec 39% de rendement, il a continué avec une autre cycloaddition sur le thioalcyne du macrocycle **2.47** avec un azoture fluorophore via une réaction « click », cette fois, avec un catalyseur d'iridium (IrAAC) par donnant finalement le macrocycle **2.48** avec 92% de rendement.

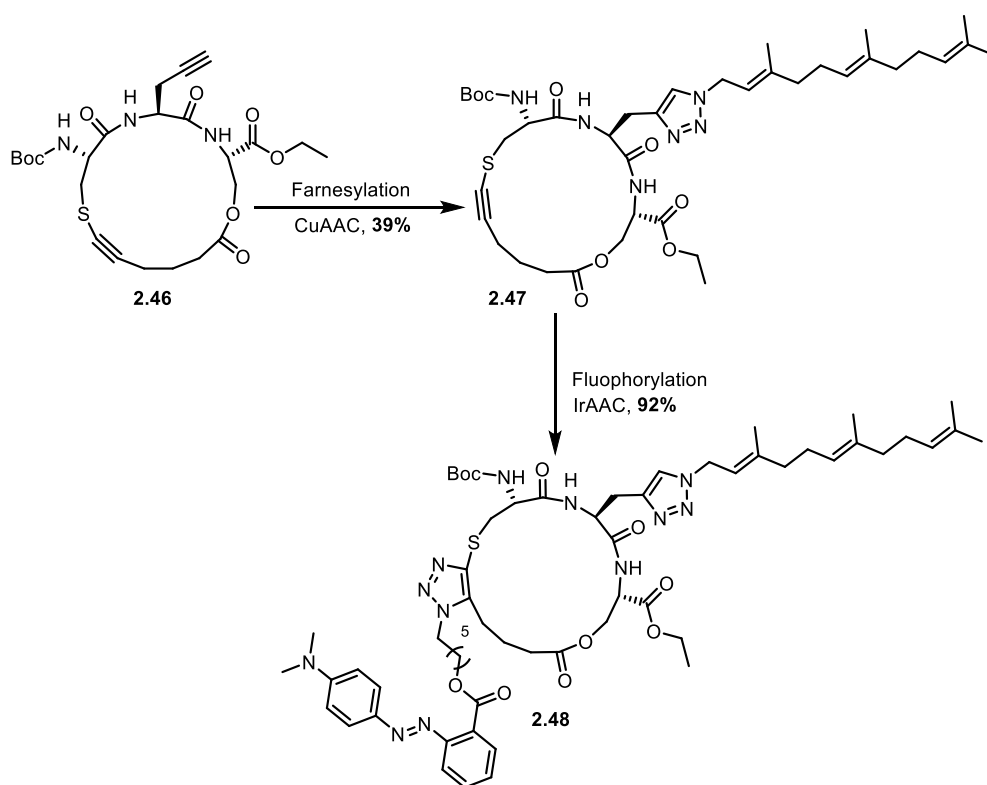
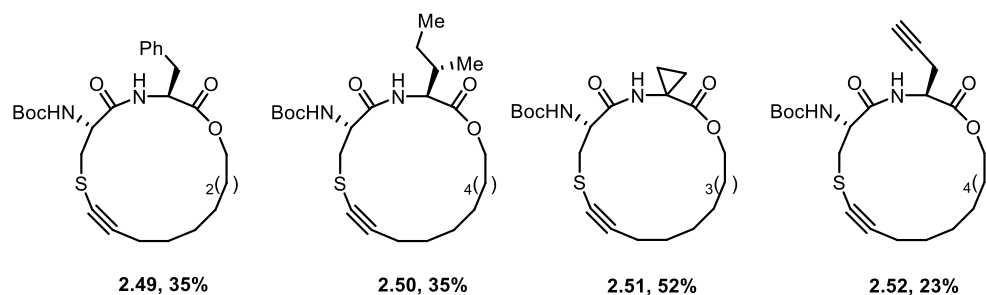


Schéma 20. – Diversification orthogonale du macrocycle **2.46**

Après la mise en place et la confirmation que la stratégie de synthèse des macrocycles tripeptidiques fonctionnait, une étude a été faite pour utiliser cette méthode de synthèse pour la synthèse de macrocycles dipeptidiques. Cette étude a été fait en collaboration avec les stagiaires internes Noémie Beaucage et Bastien Rey. En plus des 4 macrocycles tripeptidiques montrés précédemment, nous montrons également 4 macrocycles dipeptiques synthétisés avec la même stratégie de synthèse que pour la synthèse de macrocycle tripeptides<sup>[32]</sup> (tableau 8).

Tableau 8. – Macrocycles dipeptidiques synthétisés par couplage croisé entre un thiol et un bromure d'alcyne



Le macrocycle **2.49** possédant comme acides aminés la *L*-cystéine et la *L*-phénylalanine a pu être produit avec 35% de rendement. Avec cette même stratégie, le macrocycle **2.50** possédant un dipeptide *L*-cystéine/*L*-isoleucine et 19 atomes a pu être synthétisé avec 35% de rendement. La réaction de macrocyclisation pour la synthèse du macrocycle **2.51** possédant un dipeptide *L*-cystéine/acc et 18 atomes donne 52%. Enfin, un dipeptide possédant sur son deuxième acide aminé un groupement fonctionnalisable (propargyle glycine) a pu être utilisé pour la synthèse d'un macrocycle à 19 atomes **2.52** avec 23% de rendement.

## Conclusion

En conclusion, nous avons été capables de synthétiser 4 macrocycles tripeptidiques sur 5 envisagés via un couplage croisé entre un thiol et un bromure d'alcyne. Les 4 macrocycles possèdent tous un résidu de cystéine comme thiol, le troisième acide aminé est une serine donc l'alcool de la chaîne latérale a été couplé par estérification avec une chaîne carbonée possédant un bromure d'alcyne terminal. Il est possible de changer le deuxième acide aminé afin d'ouvrir la voie à différent macrocycle tripeptidique. Nous avons été capables de synthétiser des macrocycles possédants des acides aminés naturels (leucine et phénylalanine) avec, dans l'ordre, 55% et 30% de rendement. Un macrocycle possédant un acide aminé quaternaire (Acc) a pu être synthétisé avec 58% de rendement. Enfin, un macrocycle avec un acide aminé capable d'être fonctionnalisé (propargyle glycine) a été synthétisé avec 30% de rendement. Ce dernier macrocycle montre également la possibilité de fonctionnaliser deux alcynes de manière orthogonale. Nous avons tenté de former un 5<sup>ème</sup> macrocycle possédant un tryptophane comme deuxième acide aminé dans le but d'inclure un groupement indole dans le macrocycle, cette tentative a cependant échoué due à une problématique liée à la déprotection du tryptophane. Le protocole est simple à mettre en place et demande un sel de cuivre et un ligand commercialement disponible. Nous montrons ici la possibilité d'inclure des tripeptides dans le macrocycle qui, avec la présence de thioalcynes, offre des composés intéressants en chimie médicinale. En plus d'ajouter de la rigidité au macrocycle, l'inclusion de thioalcynes, ouvre différentes possibilités de diversification via oxydation comme pour l'incorporation de sulfone ou encore via cycloaddition pour ajouter des farnésyls ou encore l'ajout de fluorophores. Il est également possible d'agir sur d'autre alcyne terminal de manière orthogonale, ouvrant un grand nombre de possibilités pour modifier la structure peptidique du cycle.



## Références bibliographiques

1. Yudin, A.K., Macrocycles: lessons from the distant past, recent developments, and future directions. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 30-49.
2. Martí-Centelles, V.; Pandey, M. D.; Burguete, M. I.; Luis, S. V. Macrocyclization Reactions: The Importance of Conformational, Configurational, and Template-Induced Preorganization. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 8736-8834.
3. Gang, D.; D.W. Kim; Park, H.-S. Cyclic Peptides: Promising Scaffolds for Biopharmaceuticals. *Genes*, **2018**, *9*, 557-571.
4. White, C.J.; Yudin A.K., Contemporary strategies for peptide macrocyclization. *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 509-524.
5. Marsault, E.; Peterson, M.L. Macrocycles Are Great Cycles: Applications, Opportunities, and Challenges of Synthetic Macrocycles in Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1961-2004.
6. Liu, L., Guo, Yian; Liu, Q.; Ratnayake, R.; Luesch, H.; Ye, T. Total Synthesis of Endolides A and B. *Synlett*, **2019**, *30*, 2279-2284.
7. Gilon, C.; Mang, C.; Lohof, E.; Friedler A.; Kessler H.; Synthesis of cyclic peptide in *Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry Vol. E 22a, 4th Edition Supplement.*, A. Felix, L. Moroder and C. Toniolo, Ed.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York: **2004** p 461-529
8. du Vigneaud, V.; Ressler, C.; Swan, J.M.; Roberts, C.W.; Katsoyannis, P.G.; The Synthesis of Oxytocin. *J. Am. Chem. Soc.*, **1954**, *76*, 3115-3121.
9. Bock, V.D.; Perciaccante, R.; Jansen, T.P.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J.H.; Click Chemistry as a Route to Cyclic Tetrapeptide Analogues: Synthesis of cyclo-[Pro-Val- $\psi$ (triazole)-Pro-Tyr]. *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 919-922.
10. Thirumurugan, P.; Matosiuk D.; and Jozwiak K; Click Chemistry for Drug Development and Diverse Chemical–Biology Applications. *Chem. Rev.*, **2013**, *113*, 4905-4979.
11. Osberger, T.J.; Rogness, D. C.; Kohrt, J. T.; Stepan, A. F.; White, M.C.; Oxidative diversification of amino acids and peptides by small-molecule iron catalysis. *Nature*, **2016**, *537*, 214-219.
12. Roberts, T.C.; Smith, P. A.; Cirz, R. T.; Romesberg, F.E.; Structural and Initial Biological Analysis of Synthetic Arylomycin A2. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15830-15838.
13. Peters, D.S.; Romesberg F.E.; Baran P.S. Scalable Access to Arylomycins via C–H Functionalization Logic. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 2072-2075.
14. Roxburgh, C.J., The syntheses of large-ring compounds. *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 9767-9822.
15. Roughley, S.D.; Jordan A.M. The Medicinal Chemist's Toolbox: An Analysis of Reactions Used in the Pursuit of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3451-3479.
16. Hughes, D.; Wheeler P.; Ene D. Olefin Metathesis in Drug Discovery and Development—Examples from Recent Patent Literature. *Org. Process Res. Dev.* **2017**, *21*, 1938-1962.
17. Astruc, D. The metathesis reactions: from a historical perspective to recent developments. *New J. Chem.* **2005**, *29*, 42-56.

18. Marx, V.M.; Herbert, Myles B.; Keitz, B. K.; Grubbs, R. H. Stereoselective Access to Z and E Macrocycles by Ruthenium-Catalyzed Z-Selective Ring-Closing Metathesis and Ethenolysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 94-97.
19. Turner, R.A.; Oliver A.G.; Lokey R.S.; Click Chemistry as a Macrocyclization Tool in the Solid-Phase Synthesis of Small Cyclic Peptides. *Org. Lett.*, **2007**, *9*, 5011-5014.
20. Minehan, T.G. Tandem Bond-Forming Reactions of 1-Alkynyl Ethers. *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 1168-1181.
21. Chowdhury, R.M.; Wilden J.D., An improved transition-metal-free synthesis of aryl alkynyl sulfides via substitution of a halide at an sp-centre. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 5859-5861.
22. Dolbier, W.R.; Zheng Z. Preparation of Pentafluorosulfanyl (SF<sub>5</sub>) Pyrrole Carboxylic Acid Esters. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 5626-5628.
23. Kong, W.; Che, C.; Kong, L.; Zhu, G. Copper-catalyzed regio- and stereoselective hydroallylation of thioalkynes with allylboronates: a facile and convenient synthesis of 1,4-dienes. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 2780-2782.
24. Santandrea, J., et al., Photochemical Dual-Catalytic Synthesis of Alkynyl Sulfides. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56*, 12255-12259.
25. Arens, J.F. and T. Doornbos, The chemistry of acetylenic ethers XVI. Acetylenic thioethers. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1956**, *75*, 481-486.
26. Reeves, J.T., et al., The Reaction of Grignard Reagents with Bunte Salts: A Thiol-Free Synthesis of Sulfides. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1196-1199.
27. Distler, H., The Chemistry of Bunte Salts. *Angew. Chem. Intern. Ed. Engl.* **1967**, *6*, 544-553.
28. Bouma, M.J.; Olofsson B. General One-Pot Synthesis of Alkynyliodonium Salts and Alkynyl Benziiodoxolones from Aryl Iodides. *Chem. – Eur. J.* **2012**, *18*, 14242-14245.
29. Frei, R.; Wodrich, M. D.; Hari, D. P.; Borin, P.; Chauvier, C.; Waser, J.; Fast and Highly Chemoselective Alkynylation of Thiols with Hypervalent Iodine Reagents Enabled through a Low Energy Barrier Concerted Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 16563-16573.
30. Santandrea, J.; Godin, E.; Morency, M.; Collins S. K. General and Efficient Cu-Catalyzed Synthesis of Alkynyl Sulfide (*non publié*).
31. Liu, F.; Yi W. A thiol-free synthesis of alkynyl chalcogenides by the copper-catalyzed C–X (X = S, Se) cross-coupling of alkynyl carboxylic acids with Bunte salts. *Org. Chem. Fron.* **2018**, *5*, 428-433.
32. Godin, E.; Nguyen Thanh, S.; Guerrero-Morales, J.; Santandrea, J.; Caron, A.; Minozzi, C.; Beaucage, N.; Rey, B.; Morency, M.; Abel-Snape, X.; Collins, S. K. Synthesis and Diversification of Macrocyclic Alkynyl Sulfide Peptides (*non publié*).
33. Vardanyan, R.S.; Hruby, V.J. Antihypertensive Drugs. In *Synthesis of Essential Drugs*, R.S. Vardanyan and V.J. Hruby, Ed.; Elsevier: Amsterdam, **2006**, 295-310.
34. Lian, W.; Upadhyaya, P.; Rhodes, C. A.; Liu, Y.; Pei, D.; Screening Bicyclic Peptide Libraries for Protein–Protein Interaction Inhibitors: Discovery of a Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Antagonist. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 11990-11995.
35. Mendoza-Sanchez, R.; Corless, V.B.; Nguyen, Q.N.N.; Bergeron-Brlek, M.; Frost, J.; Adachi, S.; Tantillo, D.J.; Yudin, A.K.; Cyclols Revisited: Facile Synthesis of Medium-Sized Cyclic Peptides. *Chem. Eur. J.*, **2017**, *23*, 13319-13322.

36. Kaushik, K.N.; Kaushik, N.; Attri, P.; Kumar, N.; Kim, H. C.; Verma, K. A.; Choi, H. E. Biomedical Importance of Indoles. *Molecules*, **2013**, *18*, 6620-6662.
37. Liu, H.; Khan, M. Y.; Carvalhais, L.C.; Delgado-Baquerizo, M.; Yan, L.; Crawford, M.; Dennis, P. G.; Singh, B.; Schenk, P. M; Soil amendments with ethylene precursor alleviate negative impacts of salinity on soil microbial properties and productivity. *Sci. Rep.*, **2019**, *9*, 6892-6892.
38. Papp, M.; Moryl E. Antidepressant-like effects of 1-aminocyclopropanecarboxylic acid and d-cycloserine in an animal model of depression. *Eur. J. Pharmacol.* **1996**, *316*, 145-151.
39. Hibbs, D.E.; Hursthouse, M. B.; Jones, I. G.; Jones, W.; Malik, K. M. A.; North, M.; A facile approach for the synthesis of pseudo-peptides incorporating a (2S, 3R)-2-amino-cyclopropane carboxylic acid residue. *Tetrahedron*, **1997**, *53*, 17417-17424.
40. Talele, T.T. The "Cyclopropyl Fragment" is a Versatile Player that Frequently Appears in Preclinical/Clinical Drug Molecules. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 8712-8756.
41. Beesley, R.M.; C.K. Ingold; Thorpe J.F.; CXIX.—The formation and stability of spiro-compounds. Part I. spiro-Compounds from cyclohexane. *J. Chem. Soc., Trans.*, **1915**, *107*, 1080-1106.
42. Kaneti, J.; Kirby, A. J.; Koedjikov, A. H.; Pojarlieff, I. G.; Thorpe–Ingold effects in cyclizations to five-membered and six-membered rings containing planar segments. The rearrangement of N(1)-alkyl-substituted dihydroorotic acids to hydantoinacetic acids in base. *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, *2*, 1098-1103.
43. Jung, M.E.; Piizzi, G.; gem-Disubstituent Effect: Theoretical Basis and Synthetic Applications. *Chem. Rev.*, **2005**, *105*, 1735-1766.

## Chapitre 3. Informations Supplémentaires

### Générale

Les réactions ont été faites dans des milieux anhydres, sous atmosphère d'argon ou d'azote inerte et dans de la verrerie préalablement séchée pendant une nuit à 120 °C ou séchée par une flamme. La verrerie a ensuite été refroidie par un courant d'argon ou d'azote.<sup>1</sup> Tous les produits chimiques venaient de Sigma-Aldrich Chemical Company, Alfa Aesar ou Oakwood Chemicals, et étaient de bonne qualité. Les solvants venaient de VWR International Co. Les solvants anhydres (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Et<sub>2</sub>O, THF, DMF, toluène, et *n*-hexane) étaient séchés et desoxygenés par un système à solvant GlassContour (Irvine, CA). Les rendements isolés reflètent la masse obtenue après une chromatographie sur gel de silice. Les composés organiques ont été purifiés selon la méthode rapportée par W. C. Still<sup>2</sup> sur gel de silice venant de Silicycle Chemical division (40-63 nm; 230-240 mesh). Les analyses par chromatographie sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur du gel de silice 60 sur verre recouvert avec un indicateur fluorescent (Silicycle Chemical division, 0.25 mm, F<sub>254</sub>). Les visualisations des CCM ont été faites par UV (254 nm), avec du colorant KMnO<sub>4</sub> ou avec du colorant *p*-anisaldehyde. Tous les mélanges de solvant servant d'éluant sont rapportés par des solutions v/v. Le terme concentration réfère au retrait de composés volatiles à basse pression par un évaporateur rotatif. Tous les composés rapportés étaient homogènes par chromatographie sur couche mince (CCM) et par spectroscopie RMN <sup>1</sup>H. Les spectres RMN ont été faits dans le chloroforme deutéré CDCl<sub>3</sub> en utilisant des instruments AV-300, AV-400 et AV-500 sauf dans un cas donné. Les signaux du solvant ont servi d'étalon interne (CHCl<sub>3</sub>: δ 7.27 pour <sup>1</sup>H, δ 77.0 pour <sup>13</sup>C). Les déplacements RMN <sup>1</sup>H et les constantes de couplage ont été déterminés selon un système de premier ordre. La multiplicité des signaux est indiquée selon les indicateurs suivants. s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet), br (flou); la liste des constantes de couplages (*J*) correspond à l'ordre d'attribution de la multiplicité. La spectroscopie de masse à haute résolution (HRMS) a été faite par le Centre régional de

---

<sup>1</sup> Shriver, D. F.; Drezdon, M. A. in *The Manipulation of Air-Sensitive Compounds*; Wiley-VCH: New York, 1986.

<sup>2</sup> Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, 1494-1514.

spectrométrie de masse au Chimie, Université de Montréal dans un système Agilent LC-MSD TOF utilisant un mode d'ionisation ESI sauf dans un donné.

# Annexe

## SUPPORTING INFORMATION

### TABLE OF CONTENTS:

|  |           |
|--|-----------|
| <b>GENERAL</b>   | <b>55</b> |
| <b>SYNTHESIS OF MACROCYCLIC ALKYNYL SULFIDES TRIPEPTIDES</b> | <b>56</b> |
| <b>NMR DATA FOR ALL NEW COMPOUNDS</b>                        | <b>74</b> |

## GENERAL:

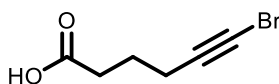
Reactions carried out under anhydrous conditions were performed under an inert argon or nitrogen atmosphere in glassware that had previously been dried overnight at 120 °C or flame dried and cooled under a stream of argon or nitrogen. All chemical products were obtained from Sigma-Aldrich Chemical Company, Alfa Aesar or Oakwood Chemicals, and were reagent quality. Technical solvents were obtained from VWR International Co. Anhydrous solvents ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ , THF, DMF, toluene, and *n*-hexane) were dried and deoxygenated using a GlassContour system (Irvine, CA). Isolated yields reflect the mass obtained following flash column silica gel chromatography. Organic compounds were purified using the method reported by W. C. Still<sup>3</sup> on silica gel obtained from Silicycle Chemical division (40-63 nm; 230-240 mesh). Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed on glass-backed silica gel 60 coated with a fluorescence indicator (Silicycle Chemical division, 0.25 mm, F<sub>254</sub>). Visualization of TLC plates was performed by UV (254 nm),  $\text{KMnO}_4$  or *p*-anisaldehyde stains. All mixed solvent eluents are reported as v/v solutions. Concentration refers to removal of volatiles at low pressure on a rotary evaporator. All reported compounds were homogeneous by thin layer chromatography (TLC) and by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. NMR spectra were taken in deuterated  $\text{CDCl}_3$  using Bruker AV-300, AV-400 and AV-500 instruments unless otherwise noted. Signals of solvent served as the internal standard ( $\text{CHCl}_3$ :  $\delta$  7.27 for  $^1\text{H}$ ,  $\delta$  77.0 for  $^{13}\text{C}$ ). The  $^1\text{H}$  NMR chemical shifts and coupling constants were determined assuming first-order behavior. Multiplicity is indicated by one or more of the following: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet), br (broad); the list of couplings constants (*J*) corresponds to the order of the multiplicity assignment. High resolution mass spectrometry (HRMS) was done by the Centre régional de spectrométrie de masse at the Département de Chimie, Université de Montréal on an Agilent LC-MSD TOF system using ESI mode of ionization unless otherwise noted.

---

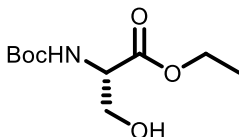
<sup>1</sup>Shriver, D. F.; Drezdon, M. A. in *The Manipulation of Air-Sensitive Compounds*; Wiley-VCH: New York, 1986.

<sup>2</sup> Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, 1494-1514.

## SYNTHESIS OF MACROCYCLIC ALKYNYL SULFIDES TRIPEPTIDES:



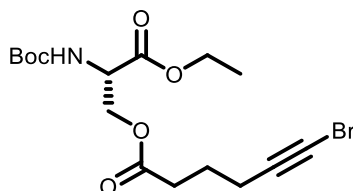
**6-Bromo-5-hexynoic acid (2.15):** To a stirred solution of hex-5-ynoic acid (1.01 g, 9 mmol, 1 equiv) in acetone (4.5 mL, 0.2 M), AgNO<sub>3</sub> (306 mg, 1.8 mmol, 20 mol%) and NBS (1.92 g, 10.8 mmol, 1.2 equiv) were added. The reaction was stirred for 2 h. Upon complete conversion (TLC and revealed using *p*-anisaldehyde stain, R<sub>f</sub> : 0.3), water was added, and the mixture was extracted 3 times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic phases were combined, washed with brine, dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and concentrated under reduced pressure to afford a yellow oil (1.68 g, 98 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 11.76 (br s, 1H), 2.49 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.31 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.88-1.81 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 179.7, 78.8, 39.0, 32.6, 23.1, 19.0; HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>BrO<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 190.9702; found 190.9699.



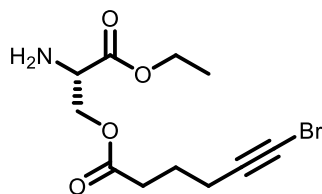
**Boc-L-Serine ethyl ester (2.17):** In a round bottom flask, *L*-serine ethyl ester (500 mg, 2.95 mmol, 1 equiv) was dissolved in water/ethyl acetate (1:1) (8.4 mL, 0.35 M). Boc<sub>2</sub>O (611 mg, 2.8 mmol, 1 equiv) was then added. Potassium carbonate (611 mg, 4.42 mmol, 1.5 equiv) was added slowly to the mixture with stirring at room temperature. The flask was sealed with a Teflon septum and stirred at room temperature for 24 h. The phases were separated, and the aqueous layer was extracted twice with ethyl acetate. The organic phases were combined, washed with brine, dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and concentrated under reduced pressure to afford a colorless oil (523 mg, 76 %). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 5.55 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.38-4.28 (m, 1H), 4.21 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.99-3.81 (m, 2H), 2.97 (s, 1H), 1.43 (s, 9H), 1.27 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



$\delta$  = 170.9, 155.8, 80.2, 63.4, 61.7, 55.8, 28.2, 14.0; HRMS (ESI)  $m/z$  calculated for  $C_{10}H_{19}NO_5Na$   $[M+Na]^+$  256.1155; found 256.1160.

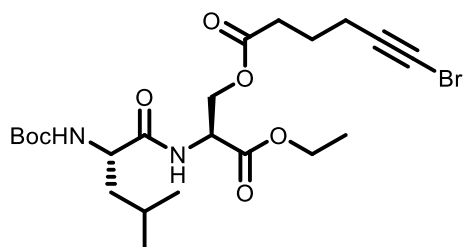


**(S)-2-((Boc)amino)-3-ethoxy-3-oxopropyl 6-bromohex-5-ynoate (2.18):** Boc-L-serine ethyl ester (2 g, 8.57 mmol, 1 equiv) and 6-bromo-5-hexynoic acid (2.13 g, 11.1 mmol, 1.3 equiv) were dissolved in dry  $CH_2Cl_2$  (86 mL, 0.1 M). HOBt-H<sub>2</sub>O (1.74 g, 12.9 mmol, 1.5 equiv), DIPEA (2.24 mL, 12.9 mmol, 1.5 equiv) and EDC-HCl (2.47 g, 12.9 mmol, 1.5 equiv) were added to the mixture which was stirred at room temperature for 18 h. When the reaction was complete (TLC R<sub>f</sub> : 0.6 using 40% ethyl acetate in hexanes), HCl 1M was added. The mixture was extracted three times with  $CH_2Cl_2$ . The combined organic phases were washed with brine, dried ( $Na_2SO_4$ ), filtered and concentrated under reduced pressure. The crude reaction mixture was purified by column chromatography on silica gel (20% ethyl acetate in hexanes) to give the desired product as a colorless oil (2.52 g, 73 %).  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  5.29 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 4.60 – 4.52 (m, 1H), 4.47 (dd,  $J$  = 11.7, 3.4 Hz, 1H), 4.35 (dd,  $J$  = 11.1, 3.2 Hz, 1H), 4.24 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 2.45 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 2.29 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 2H), 1.87-1.78 (m, 2H), 1.47 (s, 9H), 1.30 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H);  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 172.4, 169.7, 155.1, 80.2, 78.9, 64.3, 61.9, 52.9, 38.9, 32.5, 28.2, 23.2, 19.0, 14.1; HRMS (ESI)  $m/z$  calculated for  $C_{16}H_{24}BrNO_6Na$   $[M+Na]^+$  428.0679; found 428.0666.



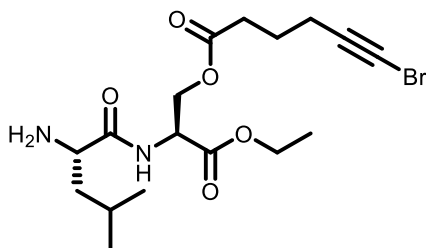
**(S)-2-Amino-3-ethoxy-3-oxopropyl 6-bromohex-5-ynoate (2.19):** Serine derivative **2.18** (1.70 g, 4.18 mmol, 1 equiv) was dissolved in  $CH_2Cl_2$ /TFA (5:1) (42 mL, 0.1 M) and the reaction was left to stir for 1 h at room temperature. Then, saturated aqueous  $NaHCO_3$  solution (40 mL) was slowly added and the phases were separated. The aqueous phase was extracted twice with  $CH_2Cl_2$  and the organic phases were combined, washed with water and brine, dried ( $Na_2SO_4$ ) and

concentrated under reduced pressure to give a yellow oil (1.0 g, 78 %).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 6.76 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 4.64 – 4.56 (m, 1H), 4.20 (qd,  $J$  = 7.2, 1.1 Hz, 1H), 3.95 (dd,  $J$  = 11.2, 4.0 Hz, 1H), 3.85 (dd,  $J$  = 11.2, 3.5 Hz, 1H), 2.37 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 2.27 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 2H), 1.89 – 1.77 (m, 2H), 1.27 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.8, 170.5, 79.1, 63.0, 61.8, 54.6, 38.7, 34.7, 23.8, 19.0, 14.0; HRMS (ESI)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{BrNO}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  306.0336; found 306.0334.

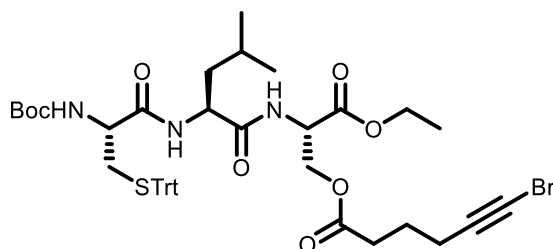


**Ethyl-O-(5-bromopent-4-yn-1-yl)-N-((tert-butoxycarbonyl)-L-leucyl)-L-serinate (2.22):**

Deprotected serine derivative **2.19** (1.00 g, 3.27 mmol, 1 equiv) and *N*-Boc-*L*-leucine (982 mg, 4.25 mmol, 1.3 equiv) were dissolved in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (33 mL, 0.1 M). HOBt- $\text{H}_2\text{O}$  (662 mg, 4.90 mmol, 1.5 equiv), DIPEA (0.853 mL, 4.90 mmol, 1.5 equiv) and EDC-HCl (939 mg, 4.90 mmol, 1.5 equiv) were added and the mixture was left to stir at room temperature for 18 h. When the reaction was complete (TLC Rf: 0.4 using 30% ethyl acetate in hexanes), HCl 1M was added. The mixture was extracted three times with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The combined organic phases were washed with brine, dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtered and concentrated under reduced pressure. The crude reaction mixture was purified by column chromatography on silica gel (20% ethyl acetate in hexanes) to give the desired product as a colorless oil (1.12 g, 66 %).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 6.80 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 1H), 4.92-4.84 (m, 1H), 4.82 (dt,  $J$  = 7.9, 3.4 Hz, 1H), 4.49 (dd,  $J$  = 11.3, 3.9 Hz, 1H), 4.38 (dd,  $J$  = 11.3, 3.5 Hz, 1H), 4.24 (q,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 4.19-4.11 (m, 1H), 2.45 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 2.29 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 2H), 1.87 – 1.78 (m, 2H), 1.74 - 1.68 (m, 2H), 1.54 – 1.48 (m, 1H), 1.46 (s, 9H), 1.30 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 3H), 0.99 – 0.94 (m, 6H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.4, 169.1, 155.5, 80.0, 78.9, 63.8, 62.0, 53.0, 51.6, 41.2, 38.9, 32.5, 28.2, 24.6, 23.2, 22.8, 21.9, 18.9, 14.0; HRMS (ESI)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{BrN}_2\text{O}_7\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  541.1520; found 541.1529.

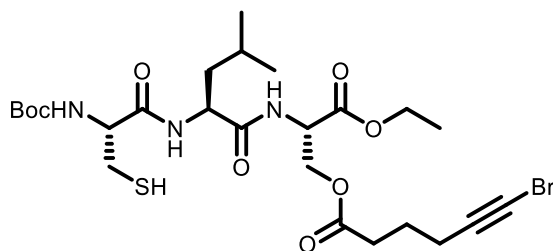


**Ethyl-*N*-(*L*-leucyl)-*O*-(5-bromopent-4-yn-1-yl)-*L*-serinate (2.23):** Dipeptide derivative **2.22** (710 mg, 1.37 mmol, 1 equiv) was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA (5:1) (13.7 mL, 0.1 M) and the reaction was left to stir for 1 h at room temperature. The reaction mixture was then concentrated to form an oil to which was added either pentane or diethyl ether to induce precipitation. The resulting solid was collected by filtration. Alternatively, following completion of the reaction, saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution (40 mL) could be slowly added. The phases were separated and the aqueous phase was extracted twice with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and the organic phases were combined, washed with water and brine, dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and concentrated under reduced pressure to give a colorless oil (573 mg, 92%). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.43 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 5.01 – 4.93 (m, 1H), 4.59 – 4.49 (m, 2H), 4.28 – 4.14 (m, 2H), 4.05 – 3.96 (m, 1H), 2.41 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.91 – 1.78 (m, 5H), 1.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.02 – 0.94 (m, 6H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.9, 170.1, 168.3, 79.3, 66.2, 62.6, 51.6, 51.0, 39.3, 38.7, 34.4, 24.3, 24.1, 22.1, 21.5, 19.1, 13.9; HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>17</sub>H<sub>28</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 419.1176; found 419.1164.



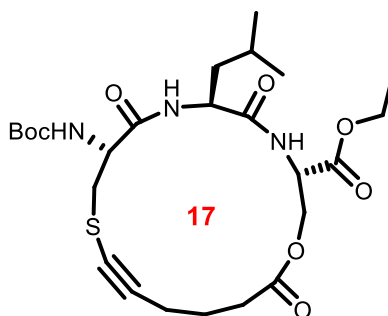
**Ethyl(6*R*,9*S*,12*S*)-12-(((6-bromohex-5-ynoyl)oxy)methyl)-9-isobutyl-2,2-dimethyl-4,7,10-trioxo-6-((tritylthio)methyl)-3-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-oate (2.20):** Deprotected dipeptide **2.23** (526 mg, 1.26 mmol, 1 equiv) and *N*-Boc-*S*-trityl-*L*-cysteine (782 mg, 1.64 mmol, 1.3 equiv) were dissolved in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (13 mL, 0.1 M). HOBt-H<sub>2</sub>O (255 mg, 1.89 mmol, 1.5 equiv), DIPEA (0.329 mL, 1.89 mmol, 1.5 equiv) and EDC-HCl (362 mg, 1.89 mmol, 1.5 equiv) were added and the mixture was left to stir at room temperature for 18 h. When the reaction was complete (TLC Rf :

0.3 using 30% ethyl acetate in hexanes ), HCl 1M was added. The mixture was extracted three times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic phases were washed with brine, dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and concentrated under reduced pressure. The crude reaction mixture was purified by column chromatography on silica gel (20% ethyl acetate in hexanes) to give the desired product as white solid (695 mg, 64 %). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.46- 7.40 (m, 6H), 7.33 – 7.27 (m, 6H), 7.26- 7.21 (m, 3H), 6.84 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 6.40 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.79 – 7.68 (m, 2H), 4.48 - 4.38 (m, 2H), 4.28 (dd, *J* = 11.3, 3.5 Hz, 1H), 4.20 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.86 – 3.76 (m, 1H), 2.76 (dd, *J* = 12.5, 6.2 Hz, 1H), 2.55 (dd, *J* = 13.1, 5.3 Hz, 1H), 2.41 (td, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 2H), 2.27 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.86 - 1.75 (m, 2H), 1.73 – 1.59 (m, 2H), 1.56 – 1.47 (m, 1H), 1.42 (s, 9H), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 0.94 – 0.88 (m, 6H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.4, 171.3, 170.5, 168.9, 144.3, 129.5, 128.1, 126.9, 80.5, 79.0, 67.2, 63.6, 61.9, 53.6, 51.7, 51.5, 40.5, 38.9, 33.1, 32.5, 28.2, 24.5, 23.2, 23.0, 21.7, 19.0, 14.1; HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>44</sub>H<sub>54</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>8</sub>SNa [M+Na]<sup>+</sup> 886.2707; found 886.2722.



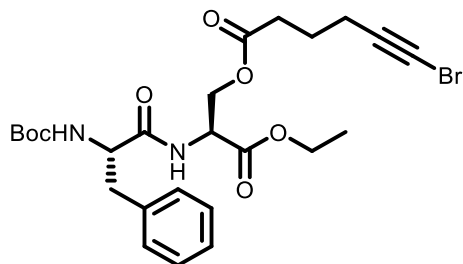
**Ethyl(6*R*,9*S*,12*S*)-12-(((6-bromohex-5-ynoyl)oxy)methyl)-9-isobutyl-6-(mercaptomethyl)-2,2-dimethyl-4,7,10-trioxo-3-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-oate (2.24):** A round bottom flask equipped with a magnetic stirrer was charged with tripeptide **2.20** (400 mg, 0.462 mmol, 1 equiv), sealed with a septum and flushed with nitrogen atmosphere. Dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4.6 mL, 0.1M) was then added followed by triisopropylsilane (0.474 mL, 2.31 mmol, 5 equiv). TFA (0.179 mL, 2.31 mmol, 5 equiv) was then added and the reaction was left to stir at room temperature for 2 h. The crude product was concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (15% ethyl acetate in hexanes) to give a white solid (245 mg, 85 %). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 6.82 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.68 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 5.40 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 4.80 (dt, *J* = 7.9, 3.7 Hz, 1H), 4.52 – 4.45 (m, 2H), 4.37 (dd, *J* = 11.3, 3.3 Hz, 1H), 4.34 – 4.30 (m, 1H), 4.24 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.13 – 3.04 (m, 1H), 2.81 – 2.71 (m, 1H), 2.45 (td, *J* = 7.4, 1.3 Hz, 2H), 2.29 (t, *J* = 6.7 Hz,

2H), 1.87 – 1.78 (m, 2H), 1.77 – 1.56 (m, 4H), 1.47 (m, 9H), 1.29 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 0.99 – 0.92 (m, 6H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 172.5, 171.5, 170.3, 169.0, 155.4, 80.7, 79.0, 63.7, 62.1, 55.6, 51.9, 51.8, 40.8, 38.9, 32.5, 28.2, 26.6, 24.6, 23.2, 22.9, 21.8, 19.0, 14.0$ ; HRMS (ESI)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{BrN}_3\text{O}_8\text{SNa}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+ 644.1612$ ; found 644.1624.

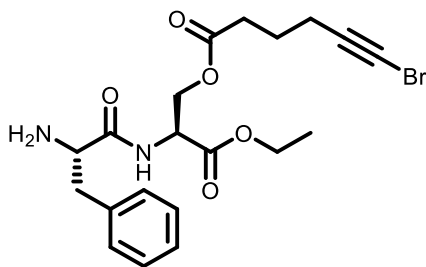


**Ethyl(3*S*,6*S*,9*R*)-9-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-6-isobutyl-5,8,17-trioxo-1-oxa-11-thia-4,7-diazacycloheptadec-12-yne-3-carboxylate (2.25):** To a round bottom flask equipped with a magnetic stir bar, dtbbpy (8.80 mg, 0.0321 mmol, 20 mol%) and 2,6-lutidine (0.374 mL, 0.321 mmol, 2 equiv) were added. The flask was purged with nitrogen then degassed acetonitrile (22 mL, 2/3 of total volume, 5 mM final concentration) was added. A solution of  $\text{Cu}(\text{MeCN})_4\text{PF}_6$  (118.5 mM in MeCN) (136  $\mu\text{L}$ , 0.0161 mmol, 10 mol%) was added to the mixture to afford a red solution. The macrocyclic precursor **2.24** (100 mg, 0.161 mmol, 1 equiv) was dissolved in degassed acetonitrile (10 mL, 1/3 of total volume), transferred into a 12 mL syringe and added dropwise over 12 h using a syringe pump (0.0138 mL/min) and the reaction mixture was stirred for a total of 18 h at room temperature. After concentration of the reaction mixture followed by purification by column chromatography on silica gel (15%  $\rightarrow$  30% ethyl acetate in hexanes), the macrocycle was obtained as a white solid (47.5 mg, 55%).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 7.11$  (d,  $J = 6.3$  Hz, 1H), 6.65 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 5.12 (d,  $J = 5.9$  Hz, 1H), 4.84 (dt,  $J = 7.7, 3.2$  Hz, 1H), 4.65 – 4.56 (m, 1H), 4.48 (dd,  $J = 11.2, 3.2$  Hz, 1H), 4.41 – 4.35 (m, 1H), 4.33 (dd,  $J = 11.4, 4.5$  Hz, 1H), 4.24 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 3.36 – 3.24 (m, 1H), 2.94 – 2.82 (m, 1H), 2.58 – 2.31 (m, 4H), 1.94 – 1.74 (m, 3H), 1.71 – 1.51 (m, 2H), 1.46 (m, 9H), 1.29 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 0.96 – 0.90 (m, 6H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 172.6, 171.2, 170.6, 168.7, 155.6, 94.4, 80.9, 68.4, 63.6, 62.0, 53.8, 51.7, 51.2, 39.6, 35.8, 32.0$ ,

29.6, 28.1, 24.5, 22.8, 21.6, 19.0, 14.1. HRMS (ESI)  $m/z$  calculated for  $C_{25}H_{39}N_3O_8SNa$   $[M+Na]^+$  564.2350; found 564.2364.

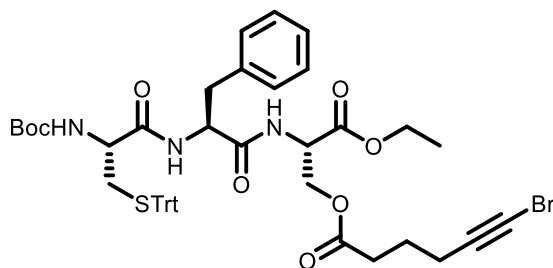


**(S)-2-((S)-2-((tert-Butoxycarbonyl)amino)-3-phenylpropanamido)-3-ethoxy-3-oxopropyl-6-bromohex-5-ynoate (2.26):** Deprotected serine derivative **2.19** (143 mg, 0.49 mmol, 1 equiv) and *N*-Boc-*L*-phenylalanine (169 mg, 0.64 mmol, 1.3 equiv) were dissolved in dry  $CH_2Cl_2$  (5 mL, 0.1 M). HOBt- $H_2O$  (99 mg, 0.73 mmol, 1.5 equiv), DIPEA (0.128 mL, 0.73 mmol, 1.5 equiv) and EDC-HCl (141 mg, 0.73 mmol, 1.5 equiv) were added and the mixture was left to stir at room temperature for 18 h. When the reaction was complete (TLC  $R_f$  : 0.3 Using 40% ethyl acetate in hexanes), HCl 1M was added. The mixture was extracted three times with  $CH_2Cl_2$ . The combined organic phases were washed with brine, dried ( $Na_2SO_4$ ), filtered and concentrated under reduced pressure. The crude reaction mixture was purified by column chromatography on silica gel (20% ethyl acetate in hexanes) to give the desired product as a white solid (130 mg, 49 %)  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 7.33 – 7.28 (m, 2H), 7.27 – 7.19 (m, 3H), 6.69 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 1H), 5.05 – 4.95 (m, 1H), 4.80 – 4.72 (m, 1H), 4.43 (dd,  $J$  = 11.3, 3.8 Hz, 2H), 4.33 (dd,  $J$  = 11.5, 3.5 Hz, 1H), 4.21 (q,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 3.09 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 2H), 2.38 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 2.27 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 2H), 1.83 – 1.75 (m, 2H), 1.42 (s, 9H), 1.27 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 3H);  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 172.4, 171.2, 168.8, 155.3, 136.3, 129.3, 128.7, 127.0, 80.3, 78.9, 63.8, 62.1, 55.6, 51.7, 39.0, 38.2, 32.5, 28.2, 23.2, 19.0, 14.1 ; HRMS (ESI)  $m/z$  calculated for  $C_{25}H_{33}BrN_2O_7Na$   $[M+Na]^+$  575.1363; found 575.1376.



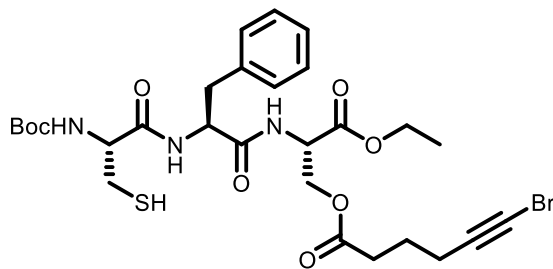
**(S)-2-((S)-2-Amino-3-phenylpropanamido)-3-ethoxy-3-oxopropyl 6-bromohex-5-ynoate (2.27) :**

Dipeptide derivative **2.26** (500 mg, 0.93 mmol, 1 equiv) was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA (5:1) (9.3 mL, 0.1 M) and the reaction was left to stir for 1 h at room temperature. The reaction mixture was then concentrated to form an oil to which was added either pentane or diethyl ether to induce precipitation. The resulting solid was collected by filtration. Alternatively, following completion of the reaction, saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution (40 mL) could be slowly added. The phases were separated and the aqueous phase was extracted twice with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and the organic phases were combined, washed with water and brine, dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and concentrated under reduced pressure to give a colorless oil (400 mg, 98%). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.46 (brs, 3H), 7.39 – 7.29 (m, 3H), 7.25 – 7.18 (m, 2H), 6.88 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.87 – 4.76 (m, 1H), 4.53 – 4.36 (m, 2H), 4.25 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.18 – 4.02 (m, 2H), 3.35 – 3.18 (m, 2H), 2.37 – 2.20 (m, 4H), 1.87 – 1.73 (m, 2H), 1.25 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 172.8, 169.3, 168.0, 133.4, 129.2, 128.1, 79.3, 65.9, 62.4, 54.1, 51.0, 38.7, 36.3, 34.4, 23.8, 19.0, 13.8; HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 475.08391; found 475.08448.



**Ethyl(6*R*,9*S*,12*S*)-9-benzyl-12-(((6-bromohex-5-ynoyl)oxy)methyl)-2,2-dimethyl-4,7,10-trioxo-6-((tritylthio)methyl)-3-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-oate (2.28):** Deprotected dipeptide **2.27** (80 mg, 0.18 mmol, 1 equiv) and *N*-Boc-*S*-trityl-*L*-cysteine (113 mg, 0.24 mmol, 1.3 equiv) were

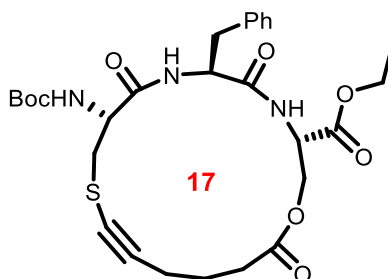
dissolved in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL, 0.1 M). HOBt- $\text{H}_2\text{O}$  (36.9 mg, 0.27 mmol, 1.5 equiv), DIPEA (0.047 mL, 0.27 mmol, 1.5 equiv) and EDC-HCl (52.4 mg, 0.27 mmol, 1.5 equiv) were added and the mixture was left to stir at room temperature for 18 h. When the reaction was complete (TLC  $R_f$  ; 0.2 using 40% ethyl acetate in hexanes), HCl 1M was added. The mixture was extracted three times with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The combined organic phases were washed with brine, dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtered and concentrated under reduced pressure. The crude reaction mixture was purified by column chromatography on silica gel (20% ethyl acetate in hexanes) to give the desired product as white solid (111 mg, 68 %).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7.45 – 7.37 (m, 6H), 7.34 – 7.27 (m, 6H), 7.26 – 7.21 (m, 5H), 7.21 – 7.15 (m, 3H), 6.74 – 6.64 (m, 1H), 6.47 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 4.70 – 4.61 (m, 2H), 4.54 (d,  $J$  = 5.6 Hz, 1H), 4.35 (dd,  $J$  = 11.4, 5.7 Hz, 1H), 4.24 (dd,  $J$  = 11.3, 3.9 Hz, 1H), 4.18 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 3.79 – 3.68 (m, 1H), 3.15 (dd,  $J$  = 13.5, 6.0 Hz, 1H), 3.03 (dd,  $J$  = 13.9, 6.6 Hz, 1H), 2.72 – 2.63 (m, 1H), 2.57 (dd,  $J$  = 13.0, 4.9 Hz, 1H), 2.37 (td,  $J$  = 7.5, 1.1 Hz, 2H), 2.26 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 1.82 – 1.73 (m, 2H), 1.37 (s, 9H), 1.26 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 172.4, 170.2, 168.6, 155.4, 144.3, 136.1, 129.5, 129.3, 128.6, 128.1, 127.04, 126.96, 80.5, 79.0, 67.3, 63.5, 61.9, 53.8, 51.8, 38.9, 37.4, 33.3, 32.5, 31.9, 28.2, 23.2, 19.0, 14.1;  $\text{C}_{47}\text{H}_{52}\text{BrN}_3\text{O}_8\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  920.2551; found 920.2578.



**Ethyl(6*R*,9*S*,12*S*)-9-benzyl-12-(((6-bromohex-5-ynoyl)oxy)methyl)-6-(mercaptopomethyl)-2,2-dimethyl-4,7,10-trioxo-3-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-oate (2.29)** : Tripeptide **2.28** (300 mg, 0.334 mmol, 1 equiv) was added in a round bottom flask with a magnetic stirrer. The flask was sealed with a septum and put under nitrogen. Dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3.3 mL, 0.1 M) was then added followed by triisopropylsilane (0.342 mL, 1.67 mmol, 5 equiv). TFA (0.128 mL, 1.67 mmol, 5 equiv) was then added and the reaction was left to stir at room temperature for 2 h. The crude product was concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (15%

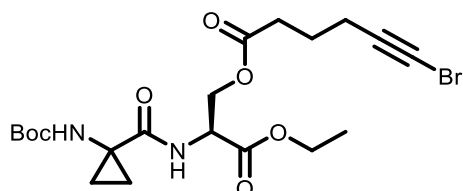


ethyl acetate in hexanes) to give a white solid (103 mg, 47 %).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7.32 – 7.28 (m, 2H), 7.27 – 7.21 (m, 3H), 6.79 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 6.68 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 1H), 5.36 – 5.28 (m, 1H), 4.79 – 4.71 (m, 2H), 4.43 (dd,  $J$  = 11.4, 4.0 Hz, 1H), 4.34 – 4.28 (m, 2H), 4.21 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 3.13 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 2H), 3.11 – 3.03 (m, 1H), 2.72 – 2.62 (m, 1H), 2.40 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 2.27 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 1.84 – 1.74 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.40 – 1.35 (m, 1H), 1.27 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 172.4, 170.2, 169.9, 168.7, 155.3, 136.0, 129.3, 128.8, 127.2, 80.8, 79.0, 63.6, 62.1, 55.6, 54.3, 51.9, 39.0, 37.9, 32.5, 28.2, 26.7, 23.2, 19.0, 14.1; HRMS (ESI)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{BrN}_3\text{O}_8\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  678.1455; found 678.1475.

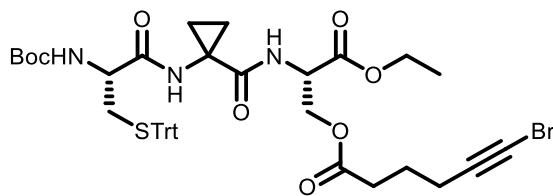


**Ethyl(3*S*,6*S*,9*R*)-6-benzyl-9-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5,8,17-trioxo-1-oxa-11-thia-4,7-diazacycloheptadec-12-yne-3-carboxylate (2.30)** : To a round bottom flask equipped with a magnetic stir bar were added dtbbpy (8.34 mg, 0.0305 mmol, 20 mol%) and 2,6-lutidine (0.036 mL, 0.305 mmol, 2 equiv). The flask was purged with nitrogen then degassed acetonitrile (20 mL, 2/3 of total volume) was added. A solution of  $\text{Cu}(\text{MeCN})_4\text{PF}_6$  (118.5 mM in MeCN) (0.13 mL, 0.0152 mmol, 10 mol%) was added to the mixture to afford a red solution. The macrocyclic precursor **2.29** (100 mg, 0.152 mmol, 1 equiv) was dissolved in degassed acetonitrile (10 mL, 1/3 of total volume), transferred into a 12 mL syringe and added dropwise over 12 h using a syringe pump (0.0138 mL/min) and the reaction mixture was stirred for a total of 18 h at room temperature. Concentration of the reaction mixture followed by purification by column chromatography on silica gel (15% → 30% ethyl acetate in hexanes), the macrocycle was obtained as a white solid (26 mg, 30%).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7.33 – 7.27 (m, 2H), 7.26 – 7.21 (m, 3H), 6.98 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 1H), 6.67 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 5.14 – 5.04 (m, 1H), 4.91 – 4.82 (m, 2H), 4.46 – 4.37 (m, 2H), 4.31 – 4.19 (m, 3H), 3.25 – 3.06 (m, 3H), 2.91 – 2.80 (m, 1H), 2.52 – 2.42 (m, 1H),

2.41 – 2.32 (m, 1H), 2.31 – 2.21 (m, 2H), 1.83 – 1.71 (m, 2H), 1.46 (s, 9H), 1.28 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 172.5, 170.14, 170.10, 168.6, 155.4, 136.1, 129.5, 128.7, 127.0, 94.8, 80.9, 67.9, 63.6, 62.1, 53.7, 53.6, 51.7, 36.8, 35.5, 32.1, 28.2, 22.8, 18.9, 14.1$ ; HRMS (ESI)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  473.2374; found 473.2397.

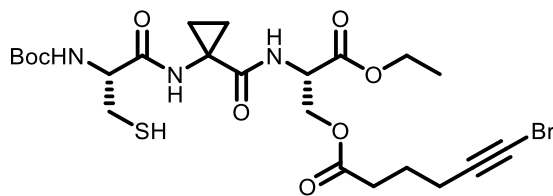


**(S)-2-(1-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)cyclopropane-1-carboxamido)-3-ethoxy-3-oxopropyl 6-bromohex-5-ynoate (2.36)** : Deprotected serine derivative **2.19** (520 mg, 1.70 mmol, 1 equiv) and 1-(Boc-amino)cyclopropanecarboxylic acid (444 mg, 2.21 mmol, 1.3 equiv) were dissolved in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (17 mL, 0.1 M). HOBT- $\text{H}_2\text{O}$  (344 mg, 2.55 mmol, 1.5 equiv), DIPEA (0.444 mL, 2.55 mmol, 1.5 equiv) and EDC-HCl (488 mg, 2.55 mmol, 1.5 equiv) were added and the mixture was left to stir at room temperature for 18 h. When the reaction was complete (TLC Rf: 0.4 using 30% ethyl acetate in hexanes), HCl 1M was added. The mixture was extracted three times with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The combined organic phases were washed with brine, dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtered and concentrated under reduced pressure. The crude reaction mixture was purified by column chromatography on silica gel (15 %  $\rightarrow$  30 % ethyl acetate in hexanes) to give the desired product as a white solid (550 mg, 66 %)  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 7.24$  (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 5.23 (brs, 1H), 4.83 – 4.72 (m, 1H), 4.48 (dd,  $J = 11.3, 3.9$  Hz, 1H), 4.39 – 4.30 (m, 1H), 4.21 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 2.41 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 2.26 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 1.84 – 1.74 (m, 2H), 1.58 – 1.50 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.27 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 1.03 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 172.4, 172.0, 169.2, 155.4, 80.6, 78.9, 63.9, 61.9, 52.1, 38.9, 35.3, 32.5, 28.1, 23.2, 19.0, 17.8, 14.1$ ; HRMS (ESI)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{BrN}_2\text{O}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  511.1050; found 511.1041.

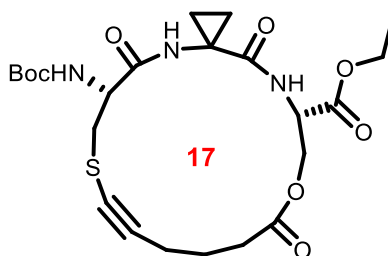


**(S)-2-(1-((R)-2-((tert-Butoxycarbonyl)amino)-3-(tritylthio)propanamido)-cyclopropane-1-**

**carboxamido)-3-ethoxy-3-oxopropyl 6-bromohex-5-ynoate (2.38):** Dipeptide derivative **2.36** (90 mg, 0.18 mmol, 1 equiv) was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA (5:1) (1.8 mL, 0.1 M) and the reaction was left to stir for 1 h at room temperature. Then, saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution (15 mL) was slowly added and the phases were separated. The aqueous phase was extracted twice with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and the organic phases were combined, washed with water and brine, dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and concentrated under reduced pressure to give a colorless oil (72 mg, 97 %). The deprotected dipeptide (200 mg, 0.51 mmol, 1 equiv) and *N*-Boc-*S*-trityl-*L*-cysteine (319 mg, 0.67 mmol, 1.3 equiv) were dissolved in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5.1 mL, 0.1 M). HOBt-H<sub>2</sub>O (104 mg, 0.77 mmol, 1.5 equiv), DIPEA (0.179 mL, 0.77 mmol, 1.5 equiv) and EDC-HCl (148 mg, 0.77 mmol, 1.5 equiv) were added and the mixture was left to stir at room temperature for 18 h. When the reaction was complete (TLC Rf: 0.3 using 40% ethyl acetate in hexanes), HCl 1M was added. The mixture was extracted three times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic phases were washed with brine, dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and concentrated under reduced pressure. The crude reaction mixture was purified by column chromatography on silica gel (15 % → 30 % ethyl acetate in hexanes) to give the desired product as white solid (280 mg, 65 %). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.45 – 7.41 (m, 6H), 7.34 – 7.28 (m, 6H), 7.26 – 7.22 (m, 3H), 6.47 (s, 1H), 4.87 – 4.81 (m, 1H), 4.75 – 4.66 (m, 1H), 4.40 – 4.34 (m, 1H), 4.30 (dd, *J* = 11.2, 5.8 Hz, 1H), 4.18 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.65 – 3.55 (m, 1H), 2.75 (dd, *J* = 13.2, 7.0 Hz, 1H), 2.60 (dd, *J* = 13.2, 5.1 Hz, 1H), 2.45 – 2.36 (m, 1H), 2.28 – 2.22 (m, 2H), 1.84 – 1.75 (m, 2H), 1.74 – 1.68 (m, 2H), 1.59 – 1.55 (m, 2H), 1.43 (s, 9H), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.03 – 0.85 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 172.8, 172.6, 171.3, 169.0, 155.8, 144.2, 129.5, 128.1, 127.0, 80.8, 79.2, 67.4, 63.4, 61.7, 54.2, 52.4, 38.8, 34.6, 32.6, 28.2, 23.2, 19.0, 17.5, 14.1; C<sub>42</sub>H<sub>48</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>8</sub>SNa [M+Na]<sup>+</sup> 856.2238; found 856.2255.

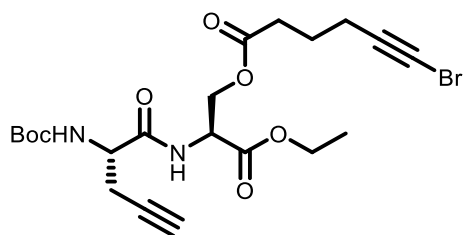


**(S)-2-(1-((R)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-mercaptopropanamido)cyclopropane-1-carboxamido)-3-ethoxy-3-oxopropyl 6-bromohex-5-ynoate (2.39)** : Tripeptide **2.38** (250 mg, 0.30 mmol, 1 equiv) was added in a round bottom flask with a magnetic stirrer. The flask was sealed with a septum and put under nitrogen. Dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL, 0.1 M) was then added followed by triethylsilane (0.239 mL, 1.5 mmol, 5 equiv). TFA (0.115 mL, 1.5 mmol, 5 equiv) was then added and the reaction was left to stir at room temperature for 2 h. Upon completion (TLC), the reaction was quenched with triethylamine (0.2 mL). The crude product was concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (100 % hexanes → 25 % ethyl acetate in hexanes) to give a white solid (103 mg, 47 %). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.38 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.04 – 6.98 (m, 1H), 5.55 – 5.45 (m, 1H), 4.84 – 4.75 (m, 1H), 4.50 – 4.43 (m, 1H), 4.41 – 4.34 (m, 1H), 4.31 – 4.25 (m, 1H), 4.25 – 4.17 (m, 1H), 3.16 – 3.06 (m, 1H), 2.89 – 2.75 (m, 1H), 2.45 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 4.43 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.87 – 1.79 (m, 2H), 1.74 (dd, *J* = 9.7, 8.1 Hz, 1H), 1.66 – 1.57 (m, 2H), 1.47 (s, 9H), 1.30 – 1.25 (m, 3H), 1.13 – 0.82 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 172.9, 171.4, 171.0, 169.2, 155.6, 81.1, 79.0, 63.8, 62.0, 56.1, 52.5, 38.9, 34.9, 32.7, 28.2, 26.5, 23.3, 19.0, 17.4, 14.1; HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>8</sub>SNa [M+Na]<sup>+</sup> 614.1142; found 614.1141.

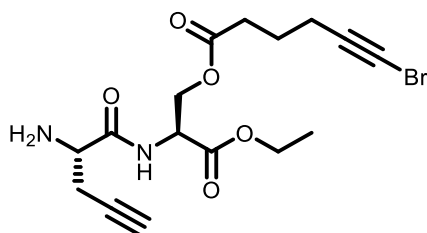


**Ethyl(6*R*,17*S*)-6-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5,14,19-trioxo-15-oxa-8-thia-4,18-**

**diazaspiro[2.16]nonadec-9-yne-17-carboxylate (2.40)** : To a round bottom flask equipped with a magnetic stir bar were added dtbbpy (9.2 mg, 0.0338 mmol, 20 mol%) and 2,6-lutidine (0.039 mL, 0.338 mmol, 2 equiv). The flask was purged with nitrogen then degassed acetonitrile (22.7 mL, 2/3 of total volume) was added. A solution of Cu(MeCN)<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> (118.5 mM in MeCN) (0.14 mL, 0.0168 mmol, 10 mol%) was added to the mixture to afford a red solution. The macrocyclic precursor **2.39** (100 mg, 0.169 mmol, 1 equiv) was dissolved in degassed acetonitrile (11.3 mL, 1/3 of total volume), transferred into a 12 mL syringe and added dropwise over 12 h using a syringe pump (0.0157 mL/min) and the reaction mixture was stirred for a total of 18 h at room temperature. Concentration of the reaction mixture followed by purification by column chromatography on silica gel (15% → 35% ethyl acetate in hexanes), the macrocycle was obtained as a white solid (50 mg, 58%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.52 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.18 (s, 1H), 5.68 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.76 – 4.68 (m, 1H), 4.57 – 4.50 (m, 1H), 4.48 (dd, *J* = 11.6, 2.6 Hz, 1H), 4.43 (dd, *J* = 11.5, 3.6 Hz, 1H), 4.22 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.22 (dd, *J* = 12.6, 6.0 Hz, 1H), 2.98 (dd, *J* = 13.8, 7.5 Hz, 1H), 2.60 – 2.50 (m, 1H), 2.50 – 2.38 (m, 3H), 1.95 – 1.85 (m, 2H), 1.70 – 1.62 (m, 1H), 1.60 – 1.52 (m, 1H), 1.47 (s, 9H), 1.30 – 1.24 (m, 3H), 1.20 – 1.01 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 173.3, 171.21, 171.19, 168.9, 155.9, 94.4, 81.2, 69.4, 64.7, 61.9, 54.9, 52.4, 35.8, 34.9, 32.6, 28.2, 22.6, 19.5, 17.4, 16.6, 14.1. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>23</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>SNa [M+Na]<sup>+</sup> 534.1881; found 534.1889.



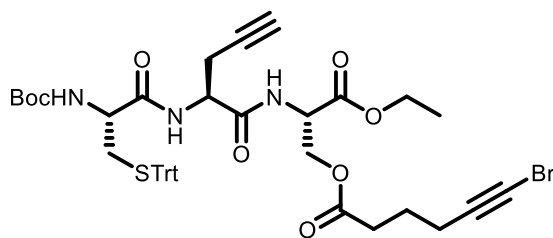
**(S)-2-((S)-2-((tert-Butoxycarbonyl)amino)pent-4-ynamido)-3-ethoxy-3-oxopropyl-6-bromohex-5-ynoate (2.42)** : Deprotected serine derivative **2.19** (520 mg, 1.7 mmol, 1 equiv) and *N*-Boc-*L*-propargylglycine (471 mg, 2.21 mmol, 1.3 equiv) were dissolved in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (17 mL, 0.1 M). HOBt-H<sub>2</sub>O (344 mg, 2.55 mmol, 1.5 equiv), DIPEA (0.444 mL, 2.55 mmol, 1.5 equiv) and EDC-HCl (488 mg, 2.55 mmol, 1.5 equiv) were added and the mixture was left to stir at room temperature for 18 h. When the reaction was complete (TLC R<sub>f</sub>: 0.3 using 30% ethyl acetate in hexanes), HCl 1M was added. The mixture was extracted three times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic phases were washed with brine, dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and concentrated under reduced pressure. The crude reaction mixture was purified by column chromatography on silica gel (30% ethyl acetate in hexanes) to give the desired product as a white solid (558 mg, 66 %) <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.09 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 5.38 – 5.29 (m, 1H), 4.85 – 4.76 (m, 1H), 4.46 (dd, *J* = 11.3, 4.0 Hz, 1H), 4.38 (dd, *J* = 11.4, 3.5 Hz, 1H), 4.35 – 4.29 (m, 1H), 4.22 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.79 (ddd, *J* = 16.7, 4.9, 2.1 Hz, 1H), 2.61 (ddd, *J* = 17.0, 6.5, 2.3 Hz, 1H), 2.42 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.27 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.10 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 1.85 – 1.75 (m, 2H), 1.46 (s, 9H), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 172.3, 170.1, 168.8, 155.2, 80.5, 79.1, 78.8, 71.7, 63.6, 62.0, 52.7, 51.9, 39.0, 32.4, 28.1, 23.1, 22.2, 18.9, 14.0; HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>7</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 523.1050; found 523.1041.



**(S)-2-((S)-2-Aminopent-4-ynamido)-3-ethoxy-3-oxopropyl-6-bromohex-5-ynoate (2.43):**

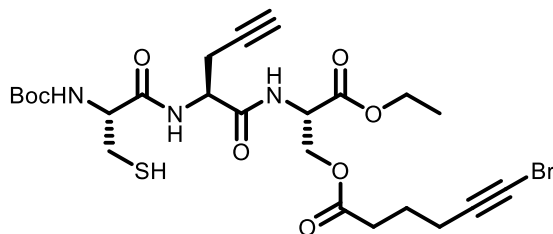
Dipeptide derivative **2.42** (558 mg, 1.11 mmol, 1 equiv) was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA (5:1) (11 mL,

0.1 M) and the reaction was left to stir for 1 h at room temperature. The reaction mixture was then concentrated to form an oil to which was added either pentane or diethyl ether to induce precipitation. The resulting solid was collected by filtration. Alternatively, following completion of the reaction, saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution (40 mL) could be slowly added. The phases were separated and the aqueous phase was extracted twice with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and the organic phases were combined, washed with water and brine, dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and concentrated under reduced pressure to give a colorless oil (402 mg, 90%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.94 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.84 – 4.75 (m, 1H), 4.51 (dd, *J* = 11.3, 3.4 Hz, 1H), 4.37 (dd, *J* = 11.5, 3.2 Hz, 1H), 4.33 – 4.28 (m, 1H), 4.25 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.99 – 2.83 (m, 2H), 2.43 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.30 (s, 1H), 2.27 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.87 – 1.75 (m, 2H), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 172.9, 168.6, 167.6, 79.0, 76.5, 74.1, 63.1, 62.4, 52.4, 51.6, 38.9, 32.5, 23.2, 21.3, 18.9, 14.0; HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> 401.0712; found 401.0708.



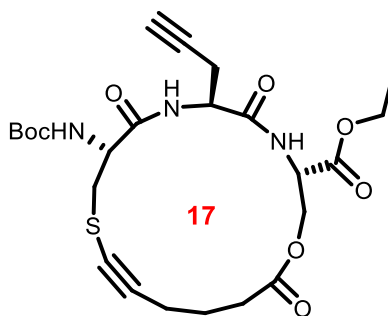
**Ethyl(6*R*,9*S*,12*S*)-12-(((6-bromohex-5-ynoyl)oxy)methyl)-2,2-dimethyl-4,7,10-trioxo-9-(prop-2-yn-1-yl)-6-((tritylthio)methyl)-3-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-oate(2.44):** The deprotected dipeptide **2.43** (402 mg, 1.0 mmol, 1 equiv) and *N*-Boc-*S*-trityl-*L*-cysteine (622 mg, 1.3 mmol, 1.3 equiv) were dissolved in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL, 0.1 M). HOBt-H<sub>2</sub>O (203 mg, 1.5 mmol, 1.5 equiv), DIPEA (0.262 mL, 1.5 mmol, 1.5 equiv) and EDC-HCl (288 mg, 1.5 mmol, 1.5 equiv) were added and the mixture was left to stir at room temperature for 18 h. When the reaction was complete (TLC Rf: 0.2 using 30% ethyl acetate in hexanes), HCl 1M was added. The mixture was extracted three times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic phases were washed with brine, dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and concentrated under reduced pressure. The crude reaction mixture was purified by column chromatography on silica gel (100% hexanes → 30% ethyl acetate in hexanes) to give the desired product as white solid (500 mg, 59 %). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.47 – 7.41 (m, 6H), 7.34 – 7.28 (m, 6H), 7.26 – 7.21 (m, 3H), 7.12 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 4.78 – 4.70

(m, 2H), 4.58 – 4.50 (m, 1H), 4.40 (dd,  $J = 11.4, 4.8$  Hz, 1H), 4.33 (dd,  $J = 11.3, 3.9$  Hz, 1H), 4.21 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 3.87 – 3.78 (m, 1H), 2.84 (ddd,  $J = 17.7, 5.4, 2.8$  Hz, 1H), 2.80 – 2.72 (m, 1H), 2.64 (dd,  $J = 13.2, 5.1$  Hz, 1H), 2.56 (ddd,  $J = 16.9, 6.7, 2.7$  Hz, 1H), 2.42 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 2.27 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 2.06 – 2.01 (m, 1H), 1.85 – 1.75 (m, 2H), 1.65 – 1.58 (m, 3H), 1.42 (s, 9H), 1.28 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 172.3, 170.5, 169.4, 168.6, 155.5, 144.2, 129.4, 128.1, 126.9, 80.6, 79.0, 78.9, 71.9, 67.3, 63.4, 62.0, 53.7, 51.9, 51.4, 38.9, 33.2, 32.5, 28.2, 23.2, 21.6, 19.0, 14.0$ . HRMS (ESI)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{43}\text{H}_{48}\text{BrN}_3\text{O}_8\text{SNa}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  868.2238; found 868.2240.



**Ethyl(6R,9S,12S)-12-(((6-bromohex-5-ynoyl)oxy)methyl)-6-(mercaptomethyl)-2,2-dimethyl-4,7,10-trioxo-9-(prop-2-yn-1-yl)-3-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-oate (2.45)** : Tripeptide **2.44** (400 mg, 0.472 mmol, 1 equiv) was added in a round bottom flask with a magnetic stirrer. The flask was sealed with a septum and put under nitrogen. Dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4.7 mL, 0.1 M) was then added followed by triethylsilane (0.377 mL, 2.36 mmol, 5 equiv). TFA (0.181 mL, 2.36 mmol, 5 equiv) was then added and the reaction was left to stir at room temperature for 2 h. Upon completion (TLC), the reaction was quenched with triethylamine (0.2 mL). The crude product was concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography on silica gel (100% hexanes  $\rightarrow$  35% ethyl acetate in hexanes) to give a colorless oil (121 mg, 42 %).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 7.18 - 7.06$  (m, 2H), 5.47 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 4.84 - 4.77 (m, 1H), 4.64 (dd,  $J = 13.6, 6.5$  Hz, 1H), 4.48 (dd,  $J = 11.4, 4.2$  Hz, 1H), 4.42 – 4.34 (m, 2H), 4.23 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 3.18 – 3.08 (m, 1H), 2.89 – 2.73 (m, 2H), 2.71 – 2.61 (m, 1H), 2.44 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 2.28 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 2.12 (t,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 1.86 – 1.77 (m, 2H), 1.66 (dd,  $J = 10.2, 7.7$  Hz, 1H), 1.46 (s, 9H), 1.29 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 172.5, 170.2, 169.2, 168.7, 155.4, 80.8, 79.0, 78.9, 72.1, 63.6, 62.2, 55.7, 52.1, 51.6, 39.0, 32.5, 28.2, 26.7, 23.2, 22.0, 19.0, 14.1$ . HRMS (ESI)  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{BrN}_3\text{O}_8\text{SNa}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  626.1142; found 626.1163.

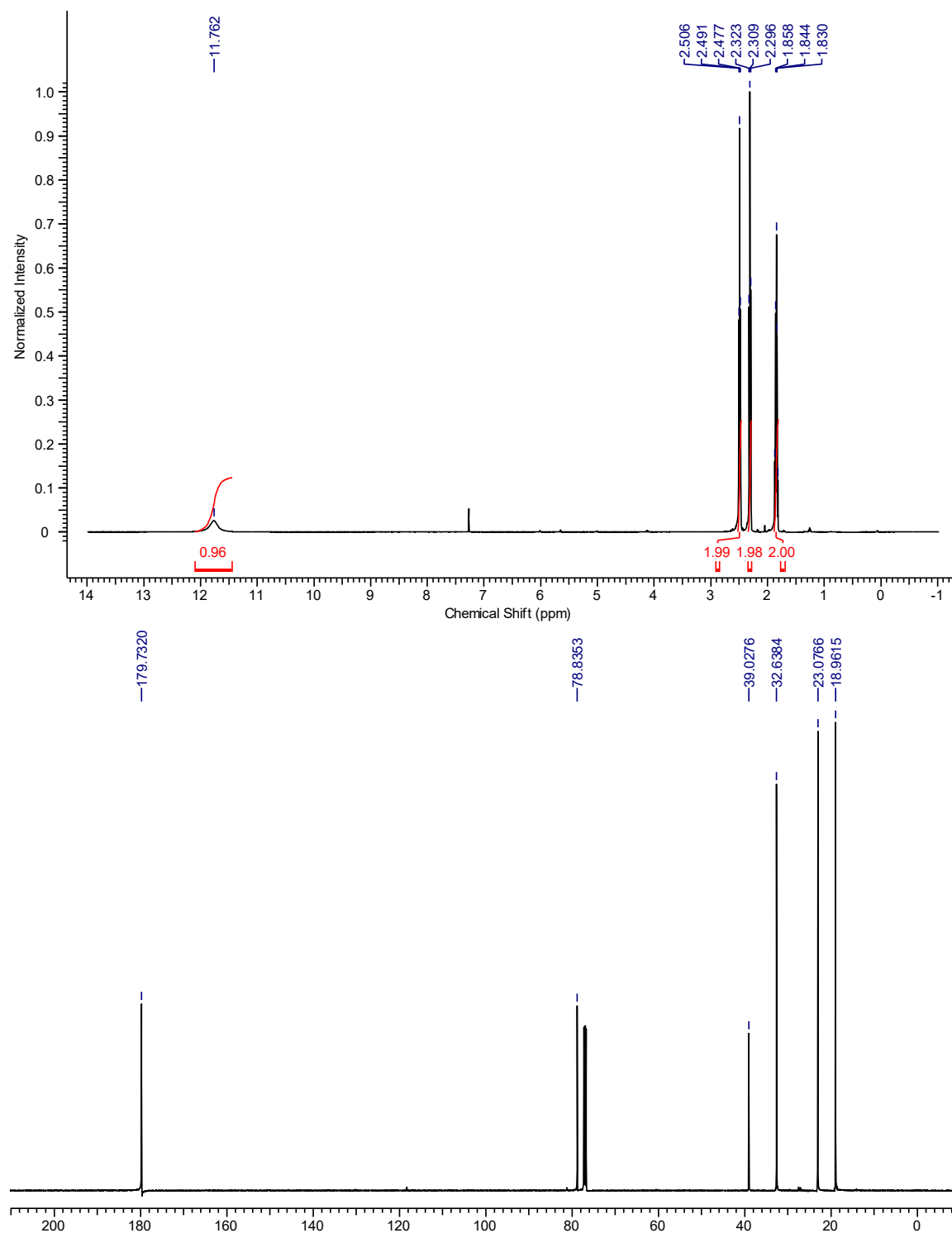




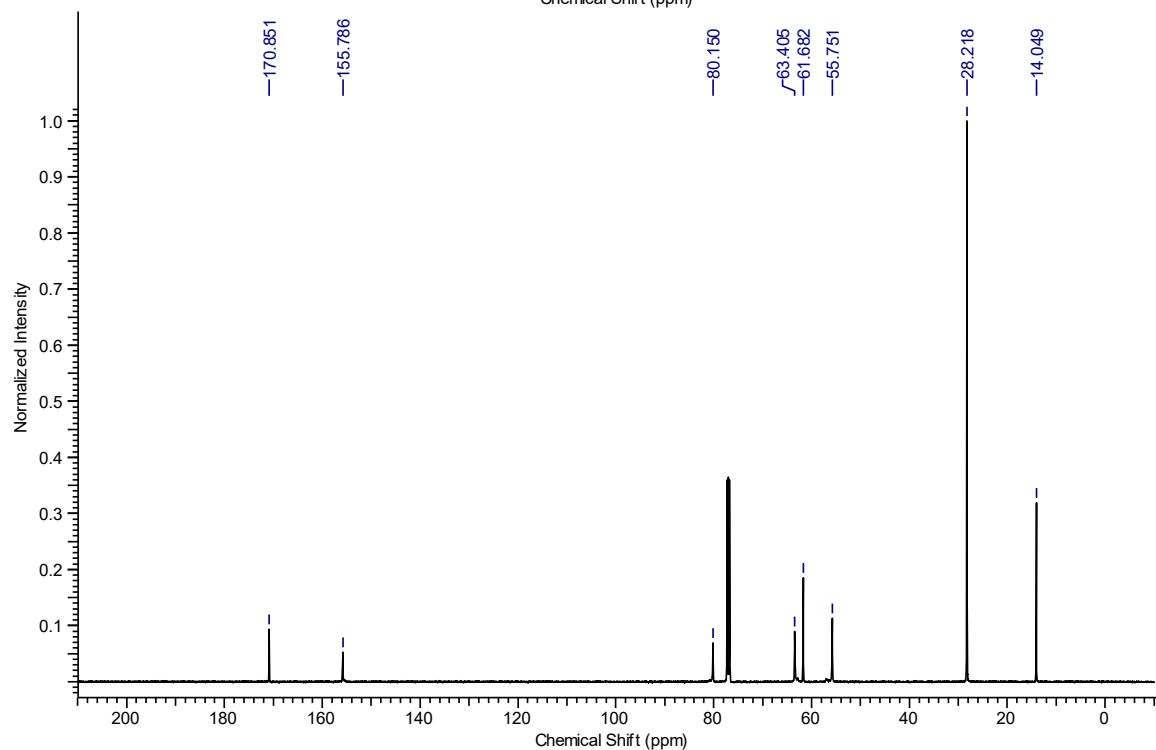
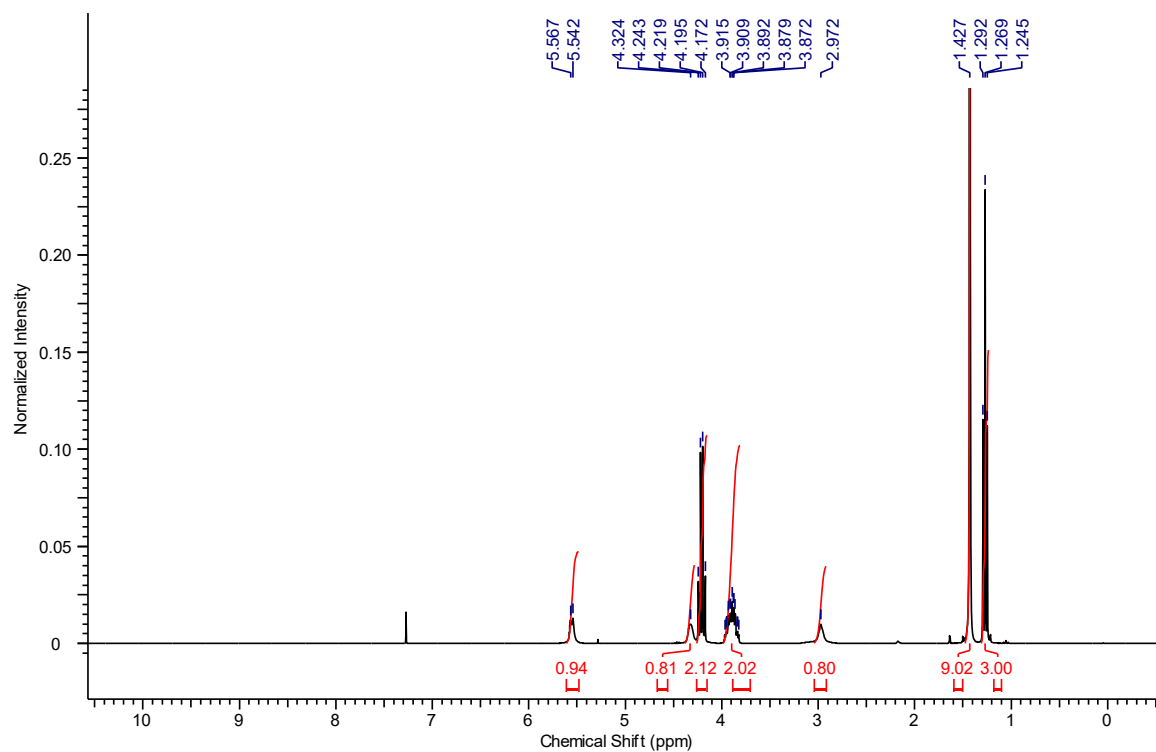
**Ethyl(3*S*,6*S*,9*R*)-9-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5,8,17-trioxo-6-(prop-2-yn-1-yl)-1-oxa-11-thia-4,7-diazacycloheptadec-12-yne-3-carboxylate (2.46)** : To a round bottom flask equipped with a magnetic stir bar were added dtbbpy (9.1 mg, 0.0331 mmol, 20 mol%) and 2,6-lutidine (0.039 mL, 0.331 mmol, 2 equiv). The flask was purged with nitrogen then degassed acetonitrile (22 mL, 2/3 of total volume) was added. A solution of Cu(MeCN)<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> (118.5 mM in MeCN) (0.14 mL, 0.0165 mmol, 10 mol%) was added to the mixture to afford a red solution. The macrocyclic precursor **2.45** (100 mg, 0.165 mmol, 1 equiv) was dissolved in degassed acetonitrile (11 mL, 1/3 of total volume), transferred into a 12 mL syringe and added dropwise over 12 h using a syringe pump (0.0153 mL/min) and the reaction mixture was stirred for a total of 18 h at room temperature. Concentration of the reaction mixture followed by purification by column chromatography on silica gel (100% hexanes → 35% ethyl acetate in hexanes), the macrocycle was obtained as a white solid (16 mg, 30%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.25 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 7.06 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.24 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.93 – 4.86 (m, 1H), 4.83 – 4.73 (m, 1H), 4.55 – 4.45 (m, 2H), 4.34 (dd, *J* = 11.3, 4.8 Hz, 1H), 4.25 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.23 – 3.13 (m, 1H), 2.98 – 2.87 (m, 2H), 2.66 (ddd, *J* = 16.8, 5.9, 2.6 Hz, 1H), 2.58 – 2.32 (m, 4H), 2.11 – 2.05 (m, 1H), 1.94 – 1.67 (m, 3H), 1.46 (s, 9H), 1.29 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 172.6, 170.4, 169.2, 168.5, 155.5, 94.8, 81.0, 79.0, 71.7, 67.8, 63.7, 62.1, 53.6, 51.8, 51.1, 35.5, 32.2, 28.2, 22.8, 21.2, 19.1, 14.1. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C<sub>24</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>SNa [M+Na]<sup>+</sup> 546.1881; found 546.1899.

## NMR DATA FOR ALL NEW COMPOUNDS

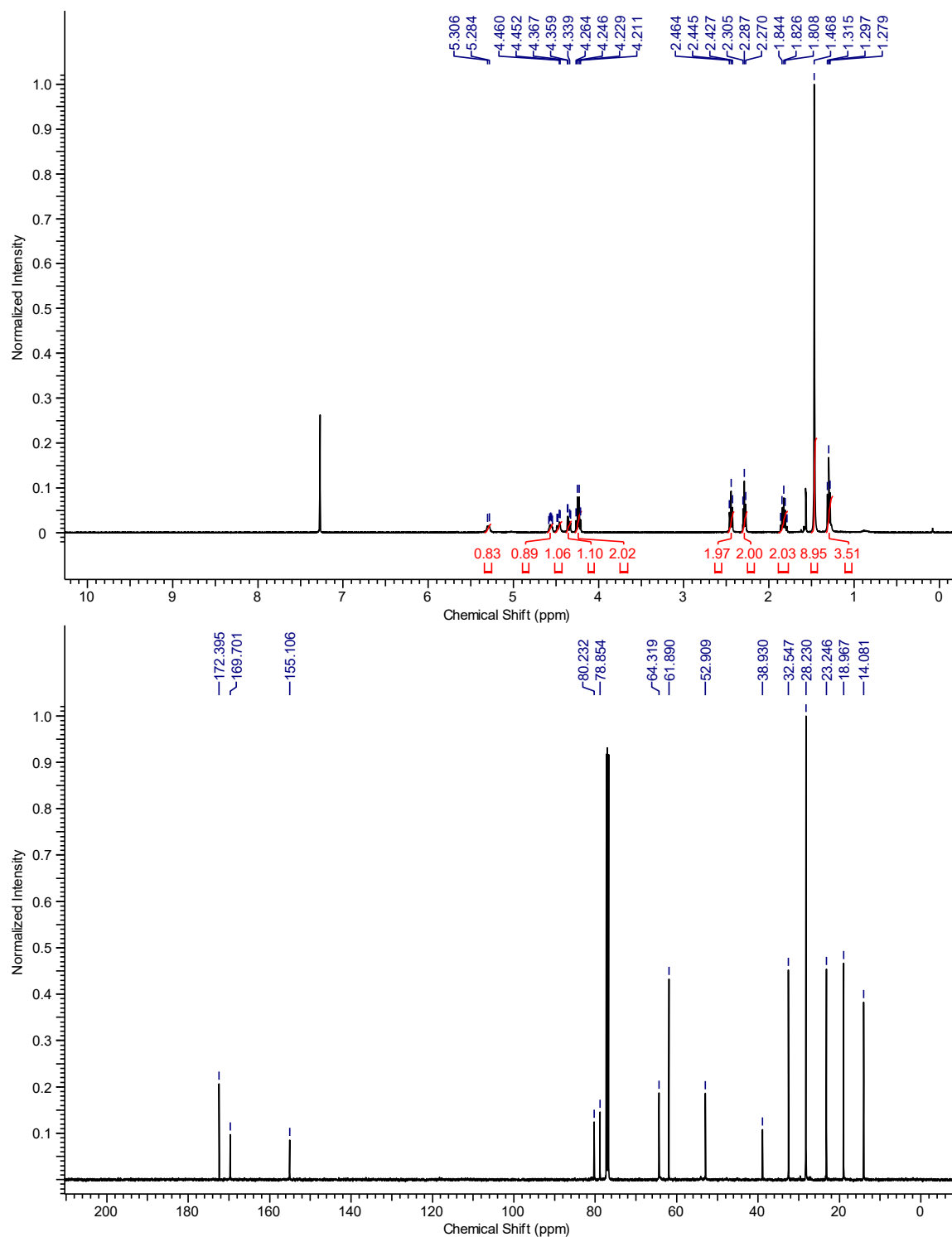
### 6-Bromo-5-hexynoic acid (2.15):



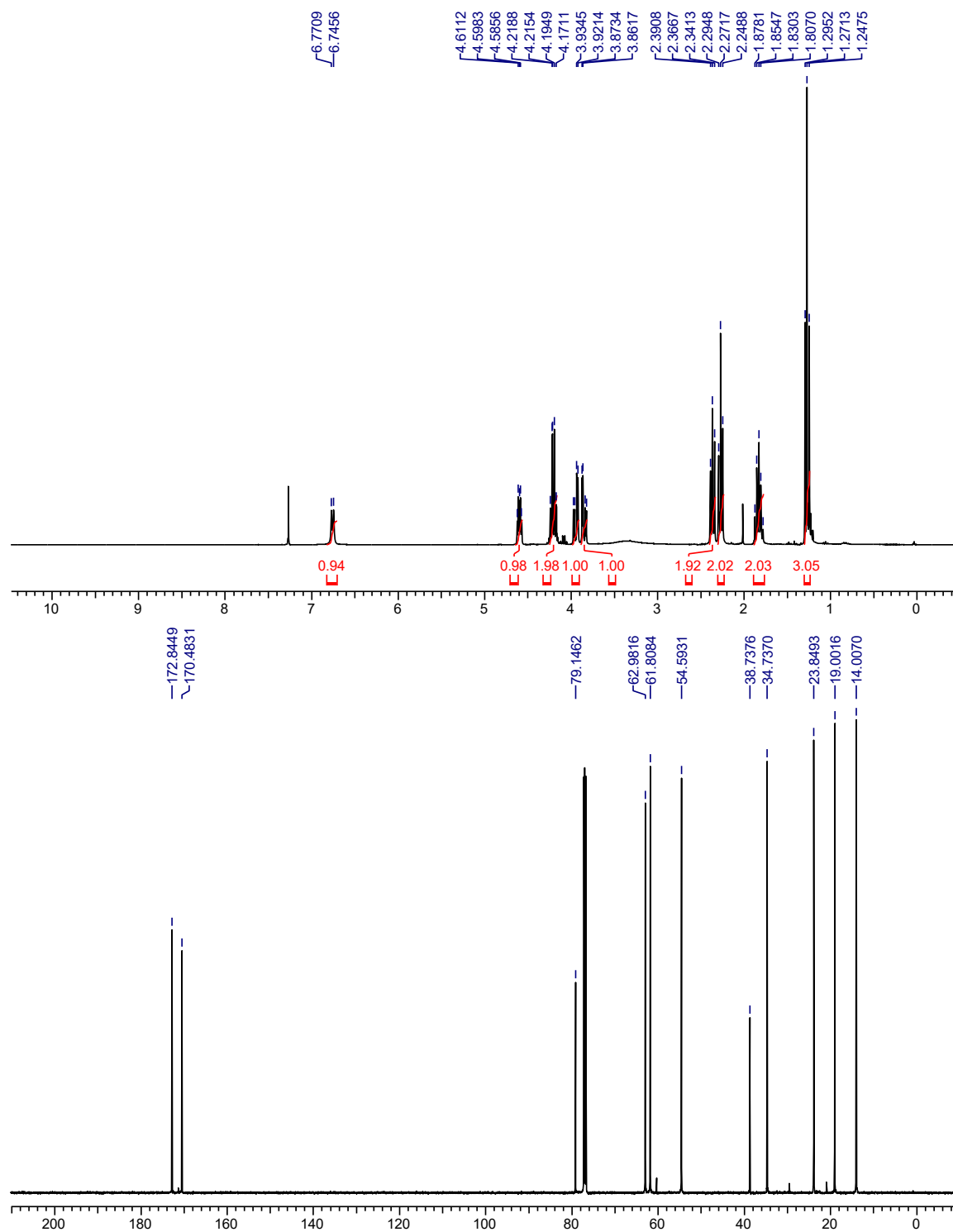
**Boc-L-Serine ethyl ester (2.17):**



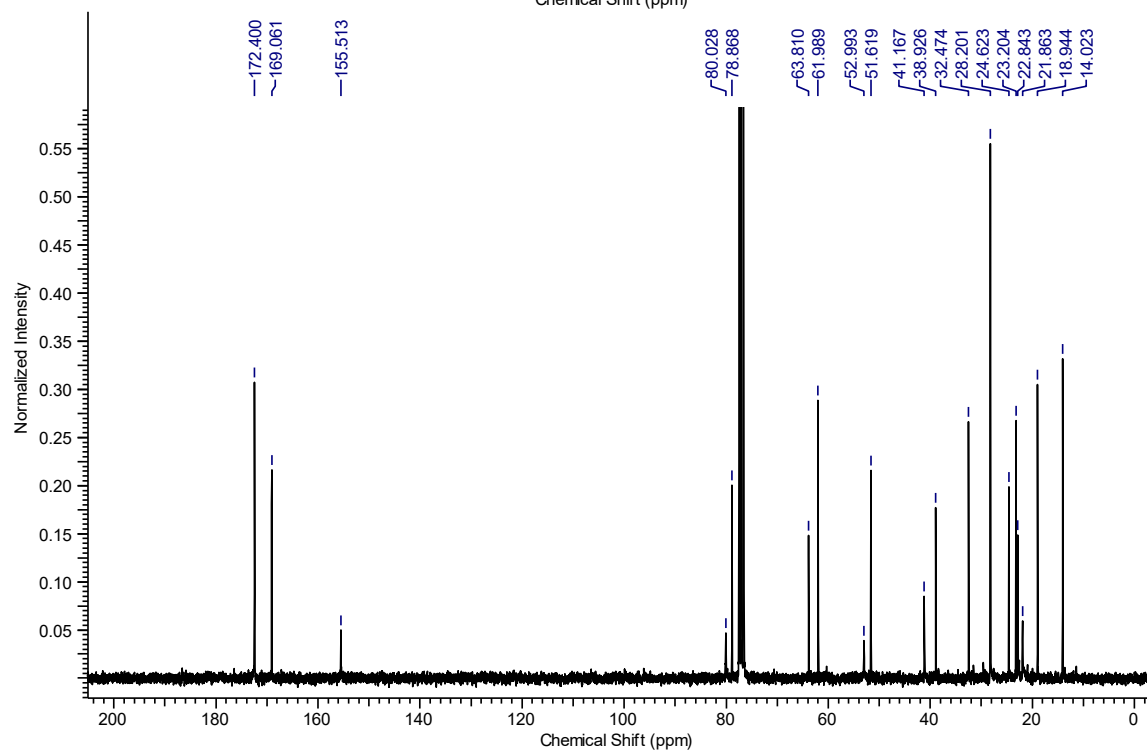
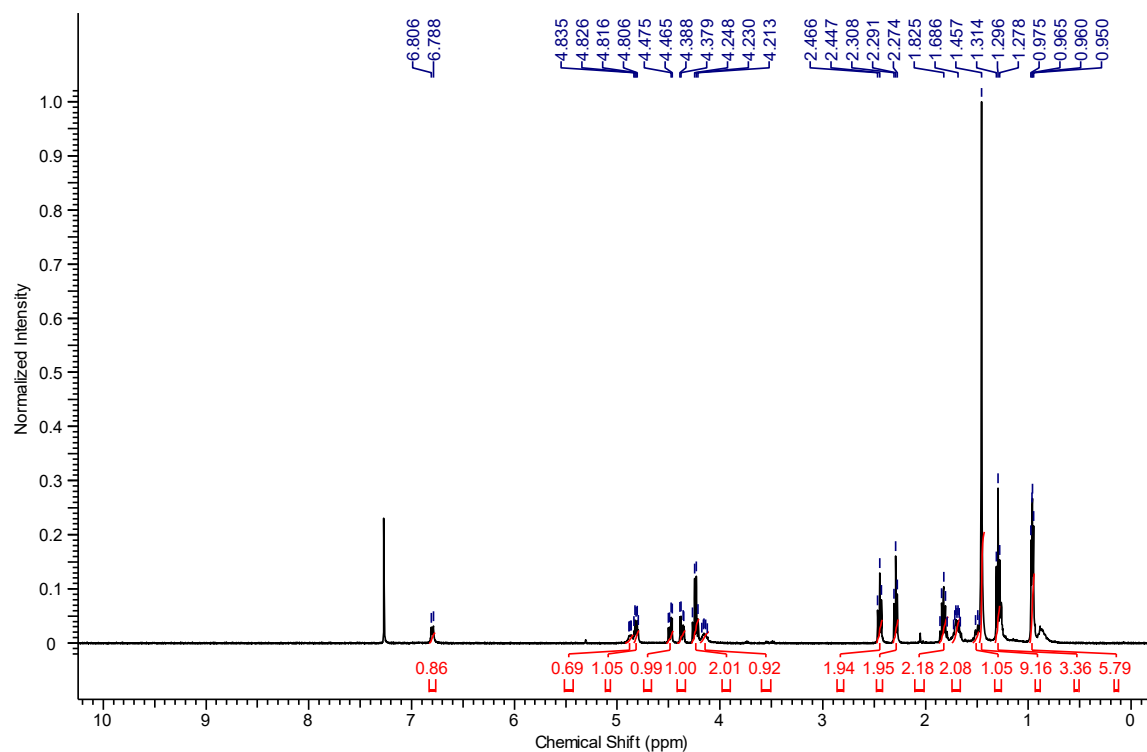
**(S)-2-((Boc)amino)-3-ethoxy-3-oxopropyl 6-bromohex-5-ynoate (2.18):**



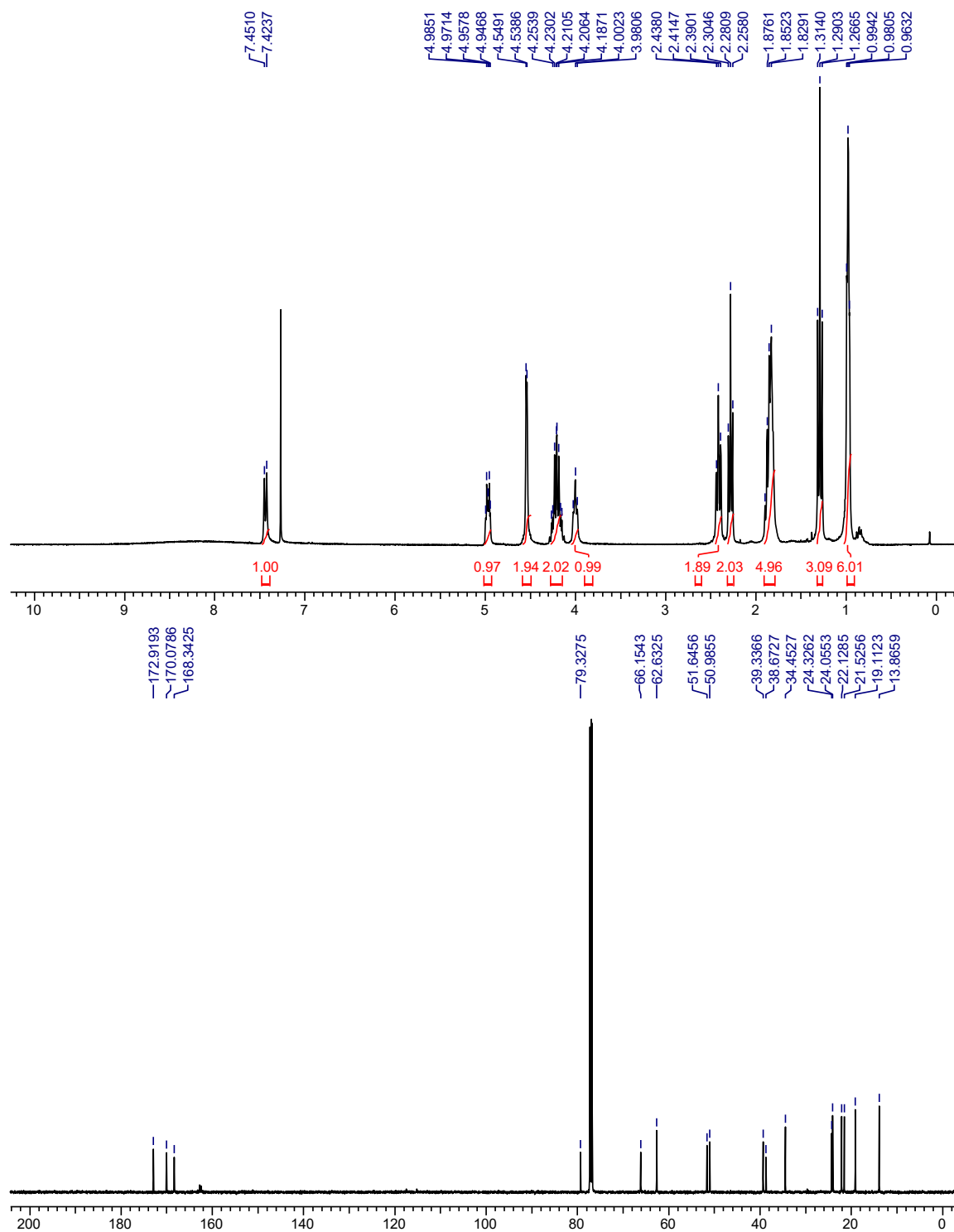
**(S)-2-Amino-3-ethoxy-3-oxopropyl 6-bromohex-5-ynoate (2.19):**



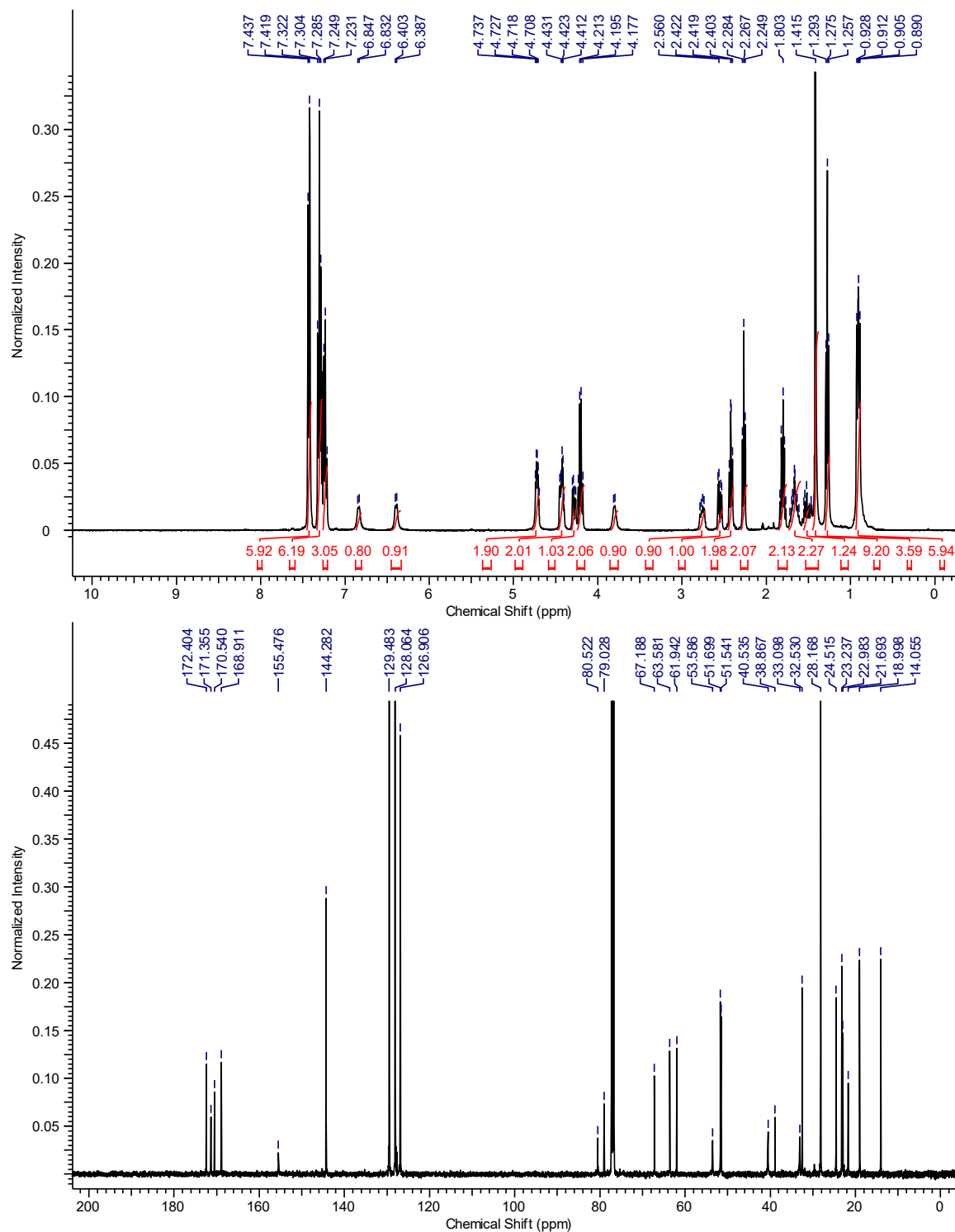
**Ethyl O-(5-bromopent-4-yn-1-yl)-N-((*tert*-butoxycarbonyl)-L-leucyl)-L-serinate (2.22):**



**Ethyl *N*-(*L*-leucyl)-*O*-(5-bromopent-4-yn-1-yl)-*L*-serinate (2.23):**

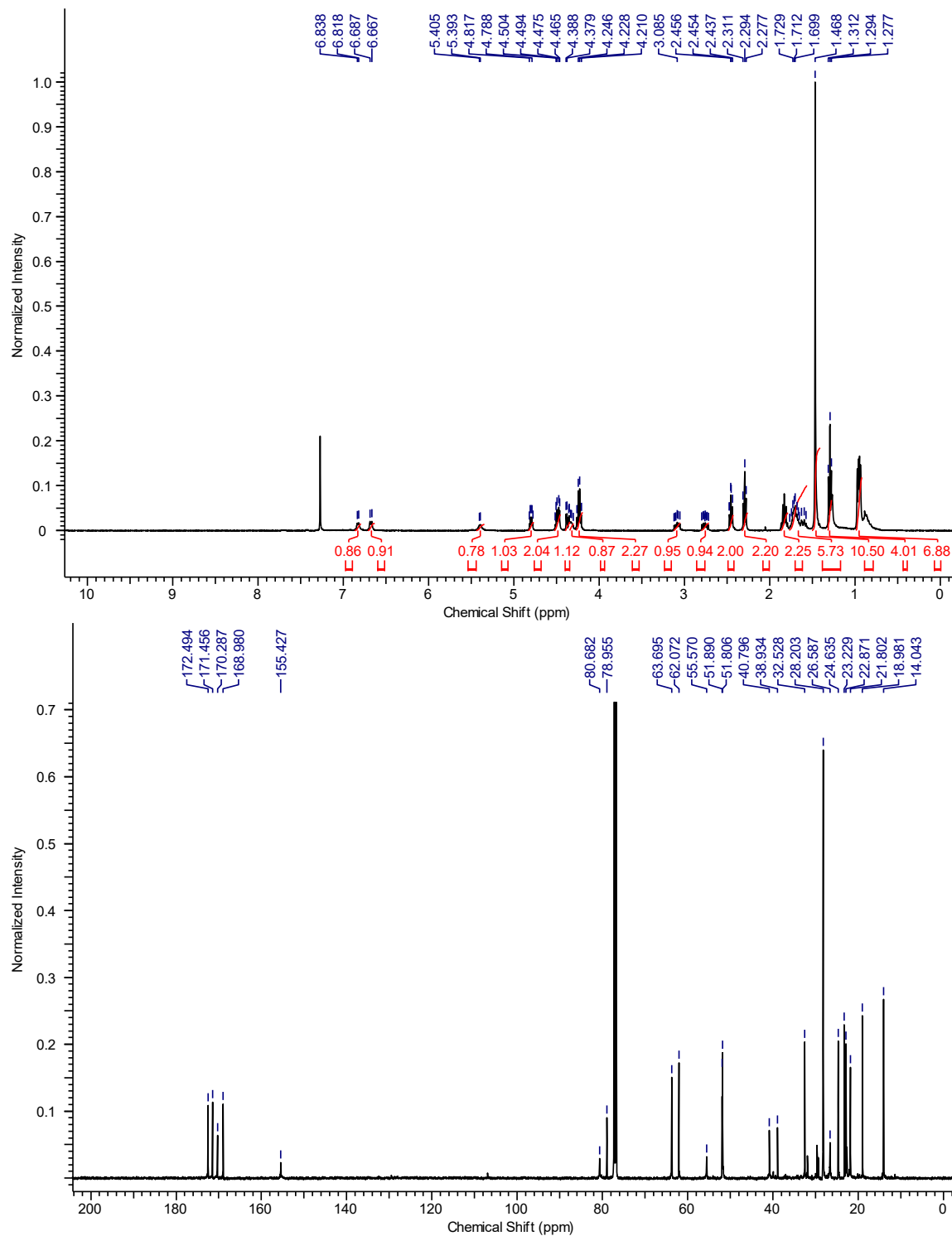


**Ethyl(6*R*,9*S*,12*S*)-12-(((6-bromohex-5-ynoyl)oxy)methyl)-9-isobutyl-2,2-dimethyl-4,7,10-trioxo-6-((tritylthio)methyl)-3-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-oate (2.20):**

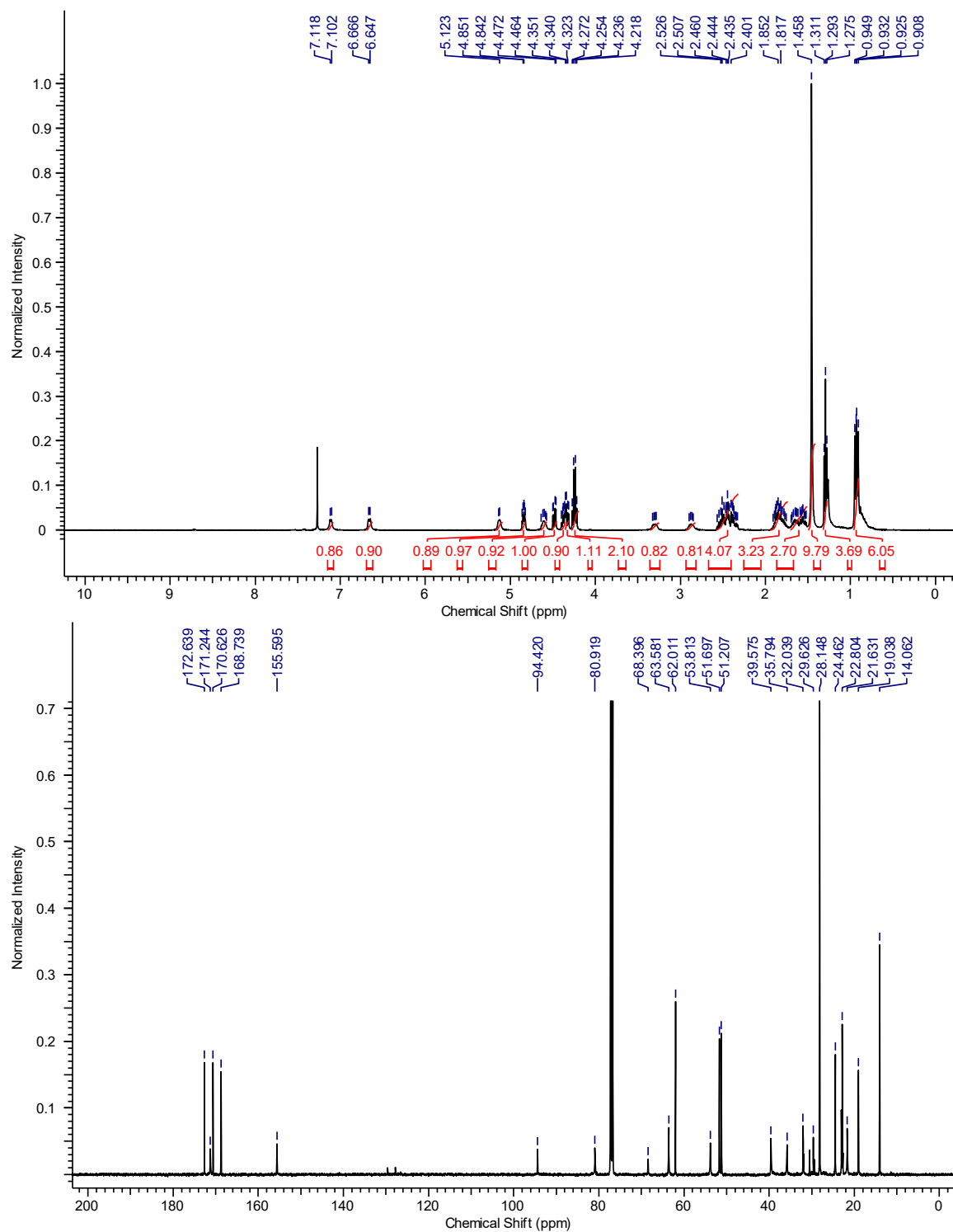




**Ethyl(6*R*,9*S*,12*S*)-12-(((6-bromohex-5-ynoyl)oxy)methyl)-9-isobutyl-6-(mercaptomethyl)-2,2-dimethyl-4,7,10-trioxo-3-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-oate (2.24):**

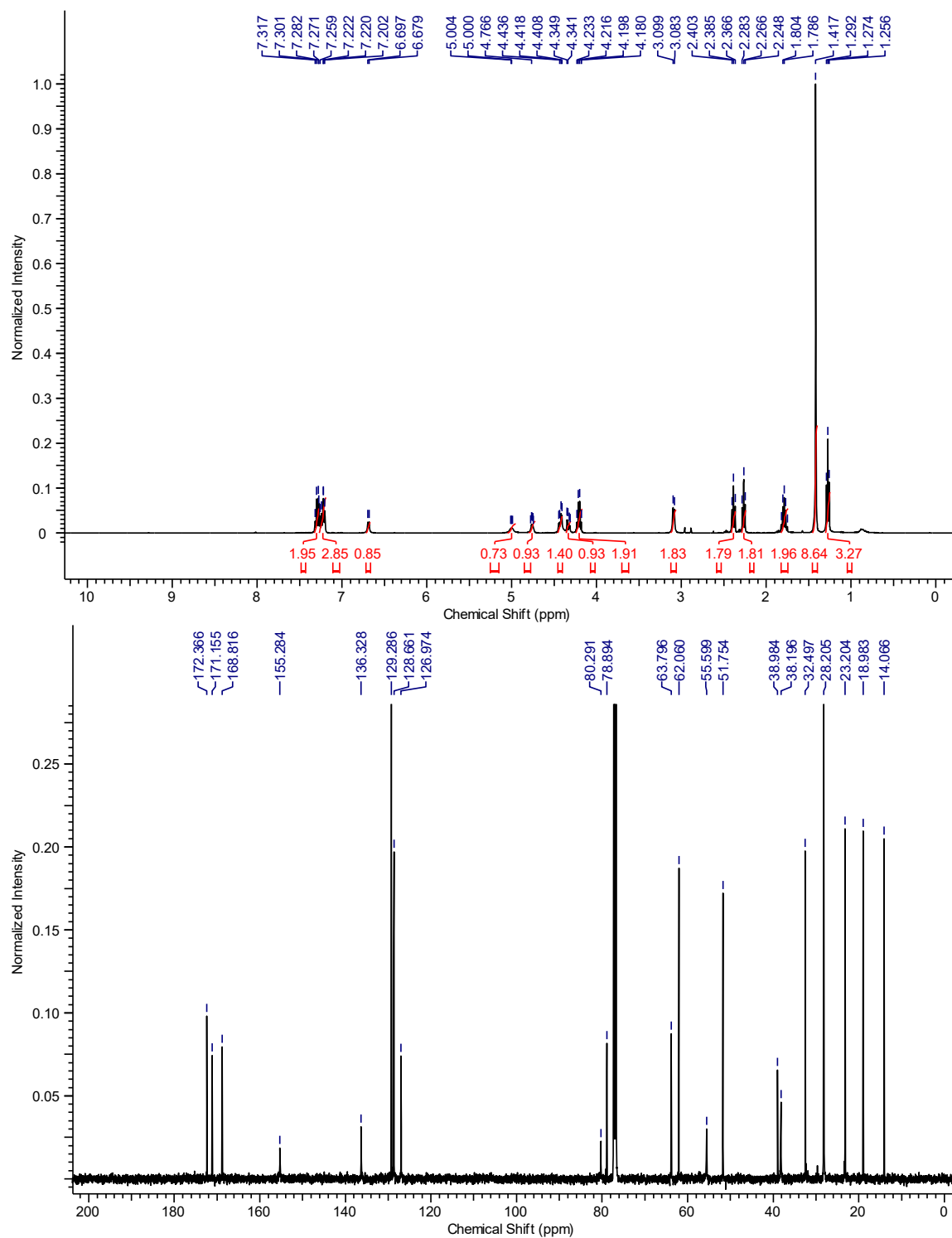


**Ethyl(3*S*,6*S*,9*R*)-9-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-6-isobutyl-5,8,17-trioxo-1-oxa-11-thia-4,7-diazacycloheptadec-12-yne-3-carboxylate (2.25):**

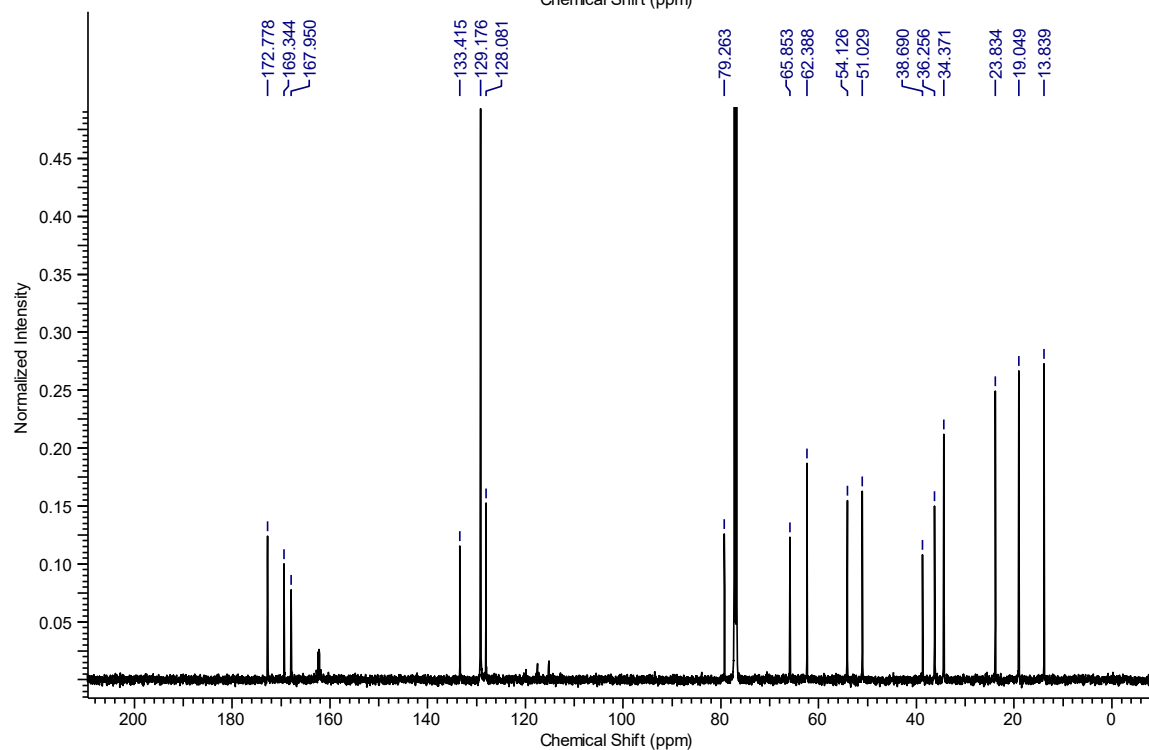
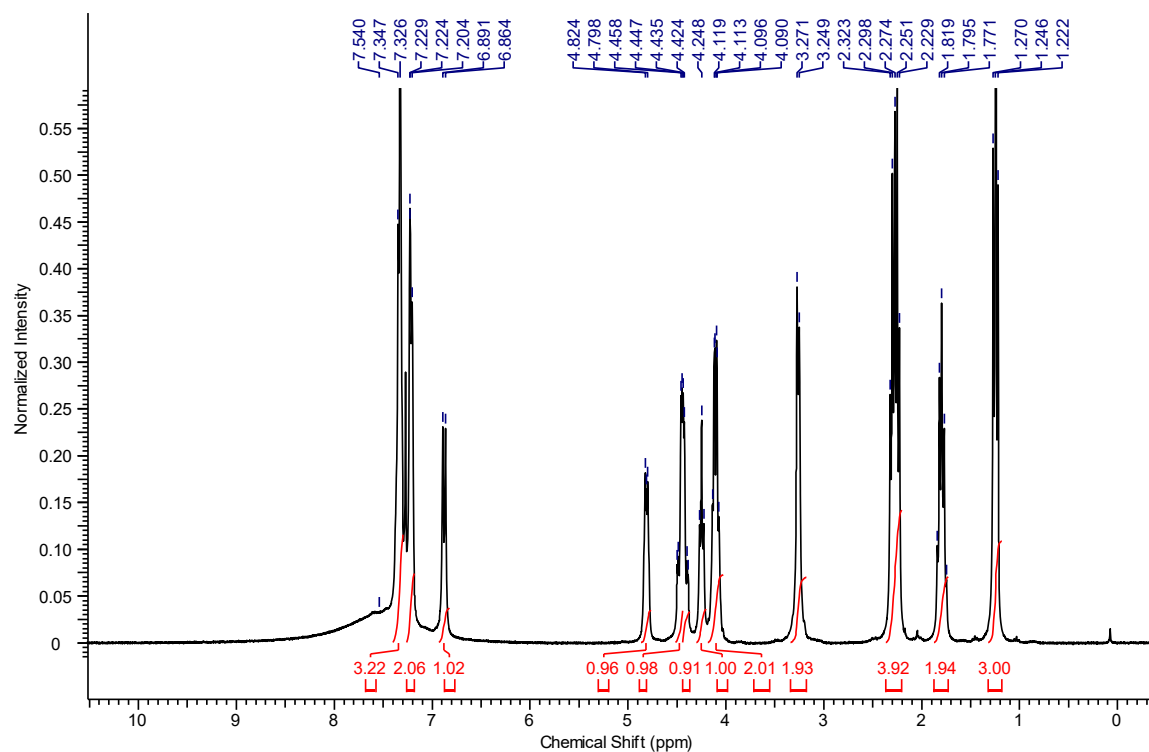


**(S)-2-((S)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-phenylpropanamido)-3-ethoxy-3-oxopropyl  
bromohex-5-ynoate (2.26) :**

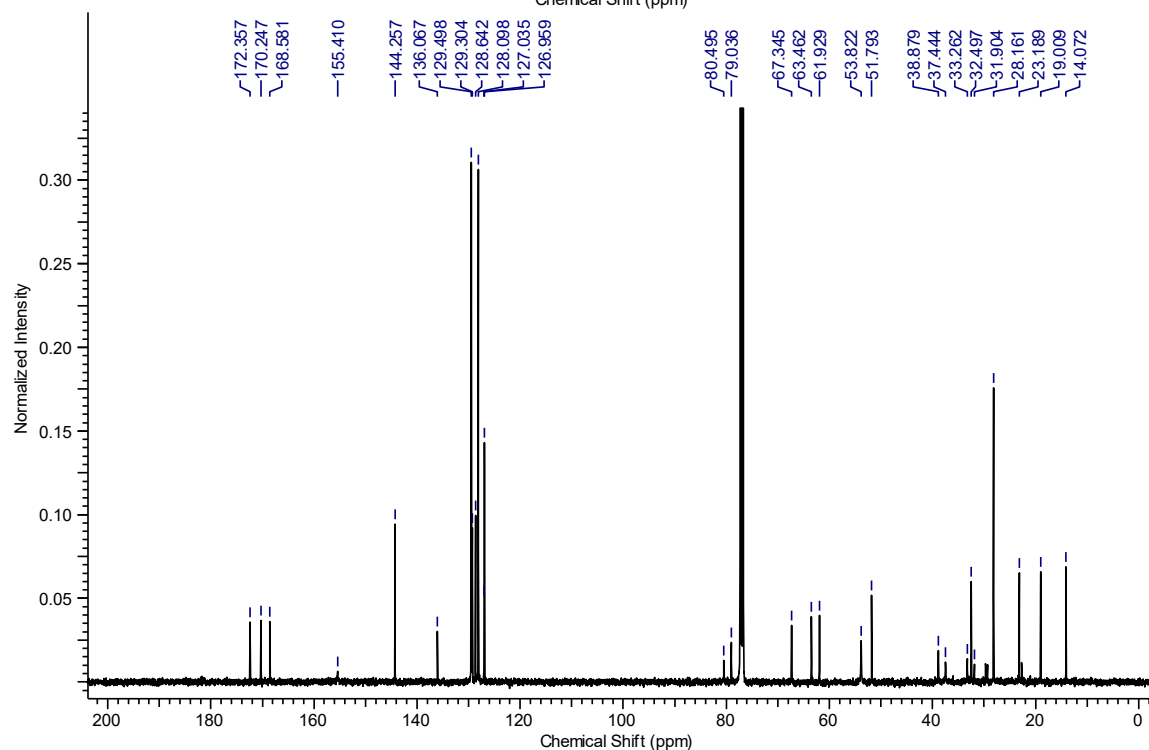
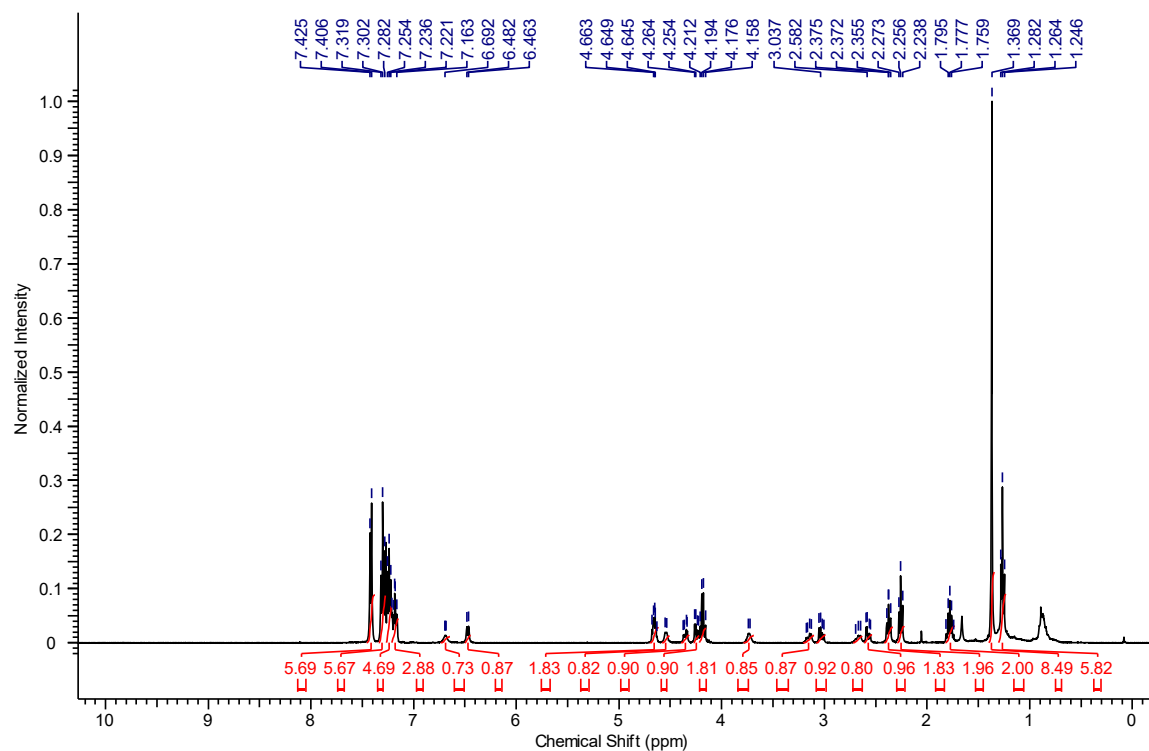
6-



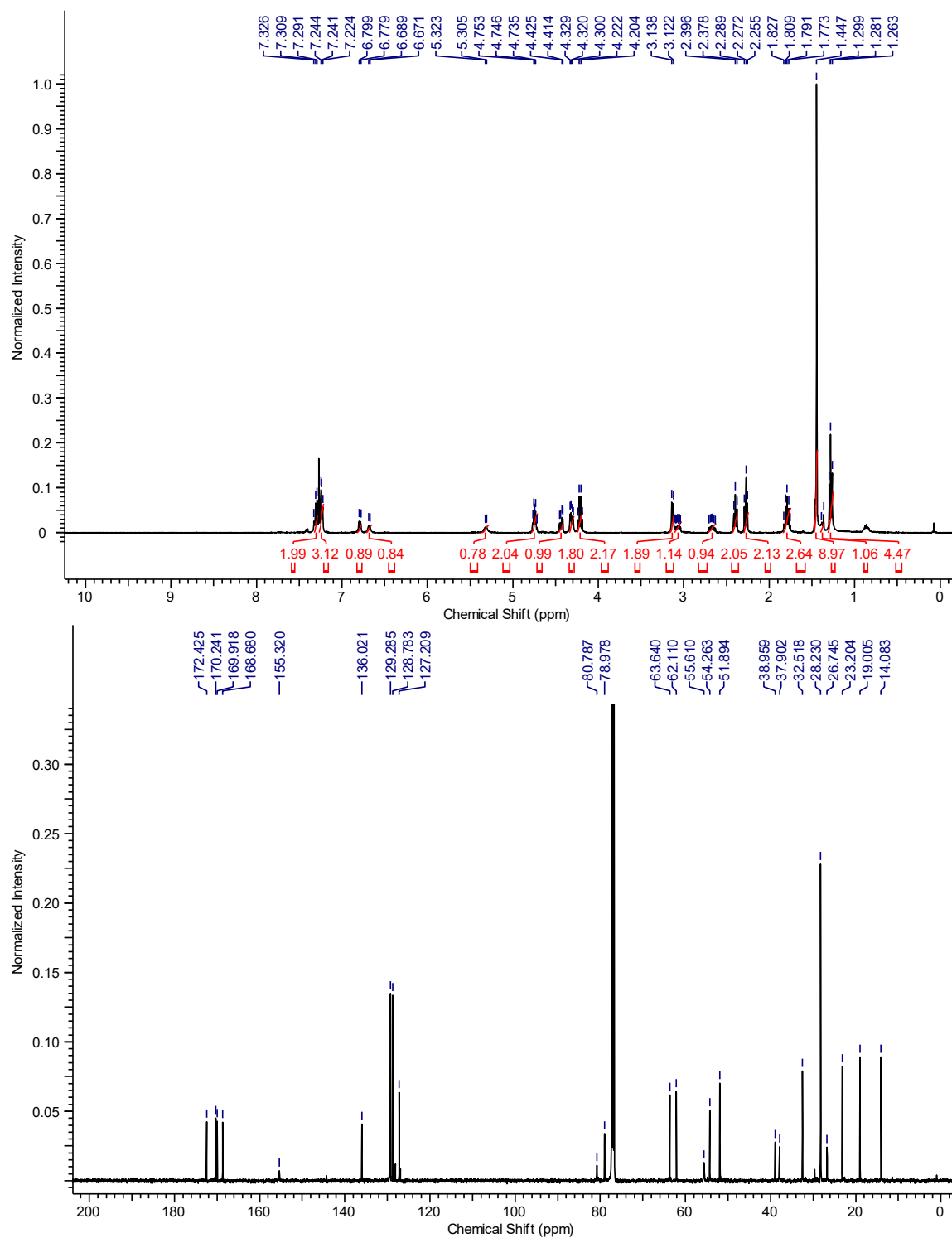
**(S)-2-((S)-2-amino-3-phenylpropanamido)-3-ethoxy-3-oxopropyl-6-bromohex-5-ynoate (2.27) :**



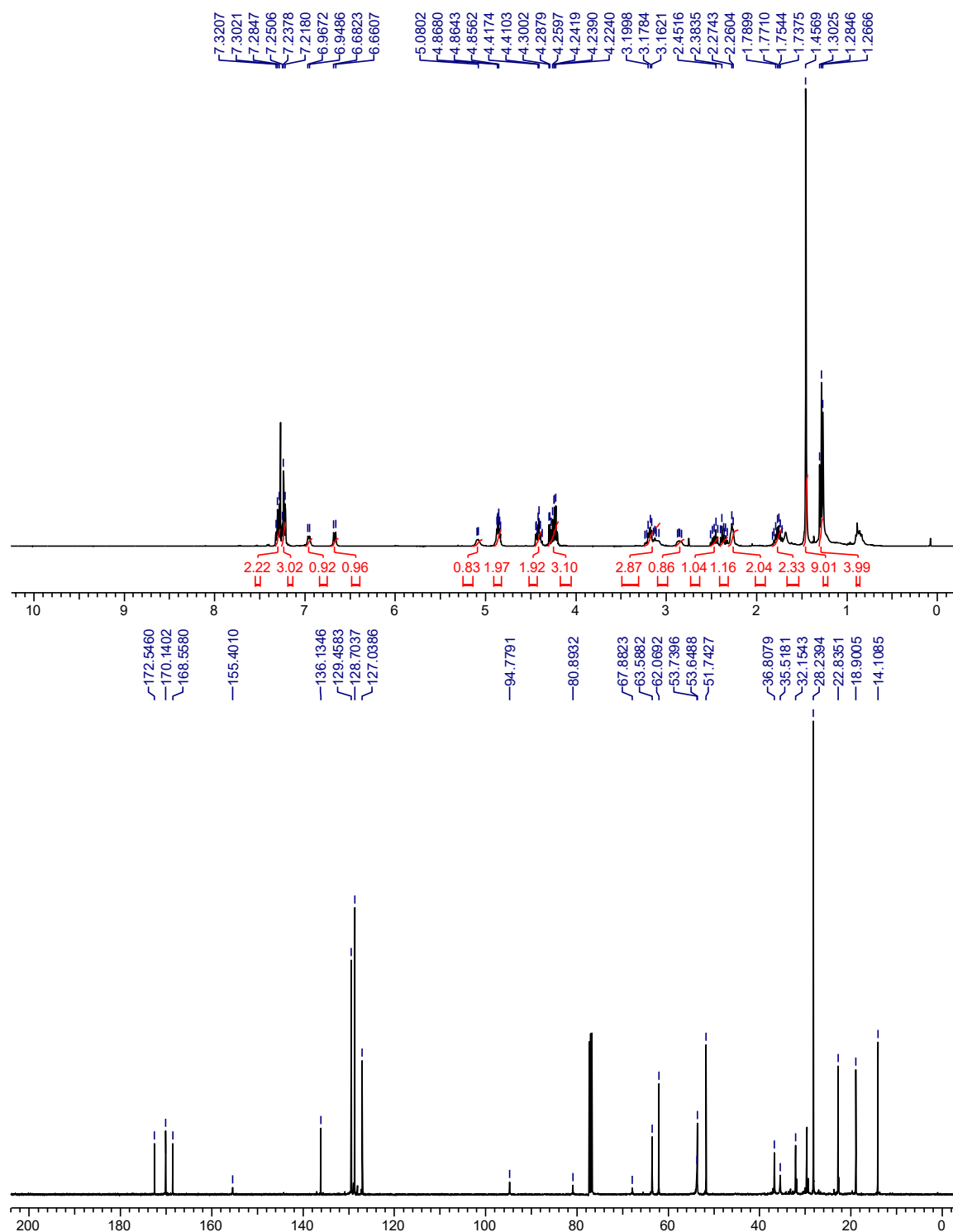
**Ethyl(6*R*,9*S*,12*S*)-9-benzyl-12-(((6-bromohex-5-ynoyl)oxy)methyl)-2,2-dimethyl-4,7,10-trioxo-6-((tritylthio)methyl)-3-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-oate (2.28):**



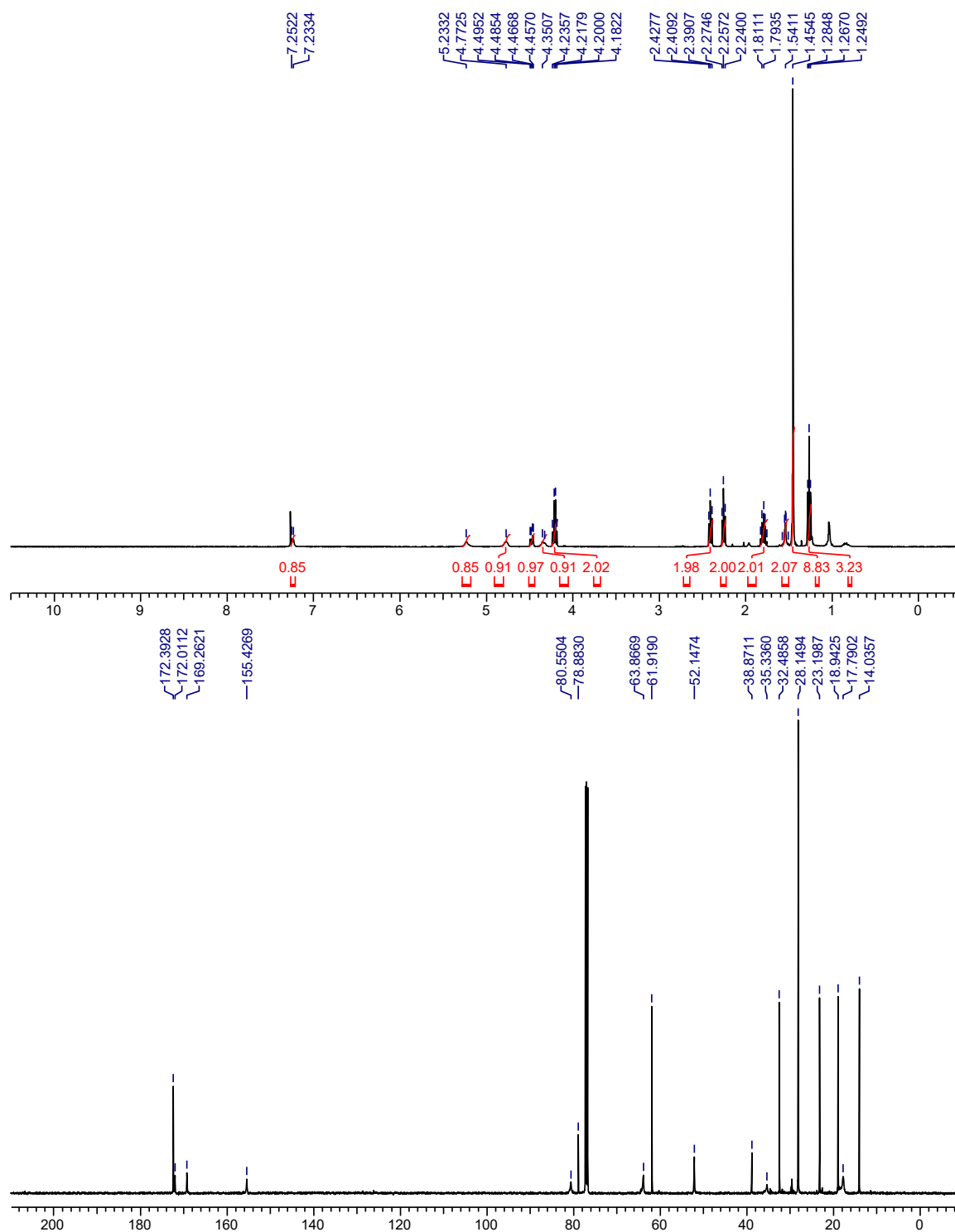
**Ethyl(6*R*,9*S*,12*S*)-9-benzyl-12-(((6-bromohex-5-ynoyl)oxy)methyl)-6-(mercaptomethyl)-2,2-dimethyl-4,7,10-trioxo-3-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-oate (2.29) :**



**Ethyl(3*S*,6*S*,9*R*)-6-benzyl-9-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5,8,17-trioxo-1-oxa-11-thia-4,7-diazacycloheptadec-12-yne-3-carboxylate (2.30) :**

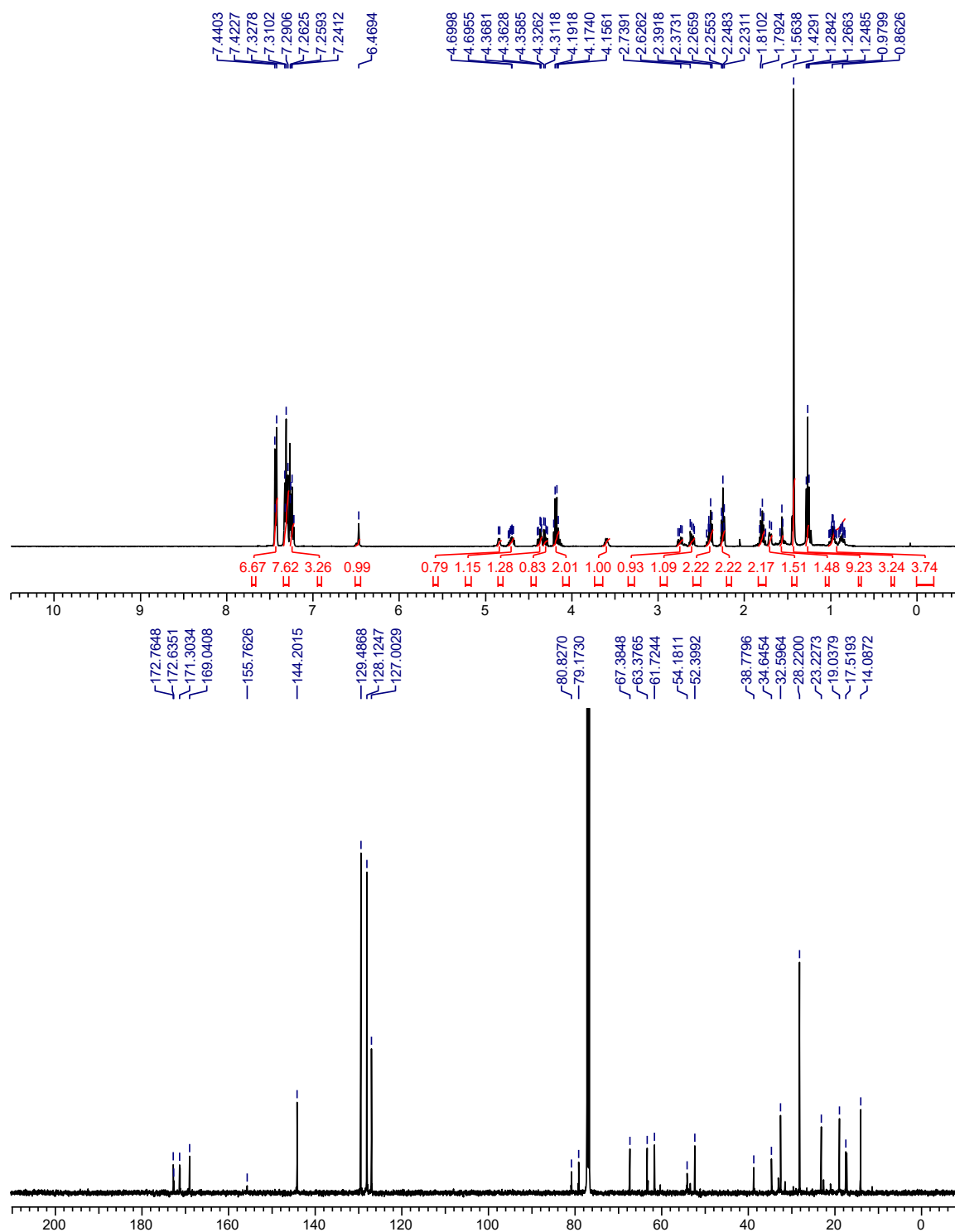


**(S)-2-(1-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)cyclopropane-1-carboxamido)-3-ethoxy-3-oxopropyl 6-bromohex-5-ynoate (2.36) :**

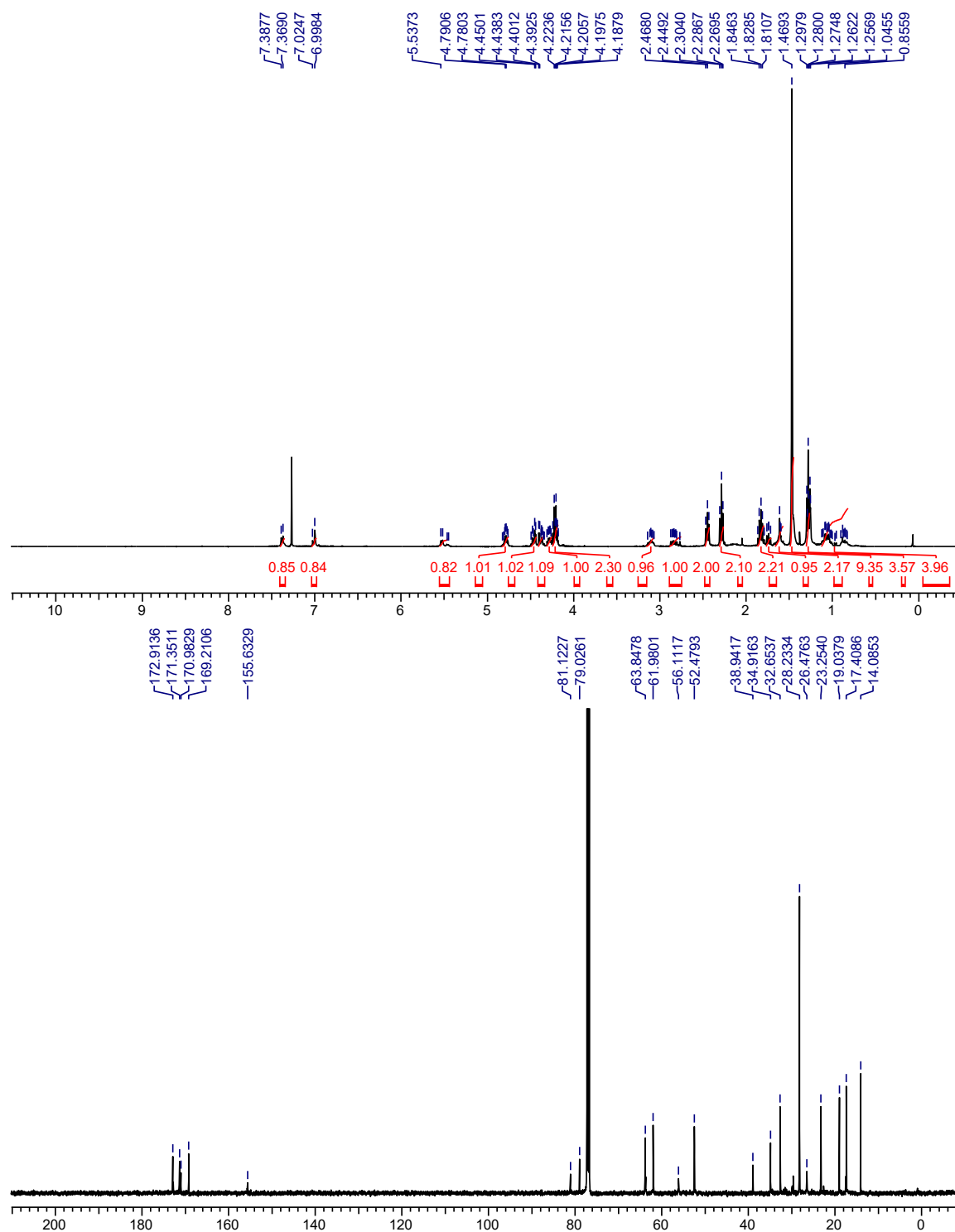




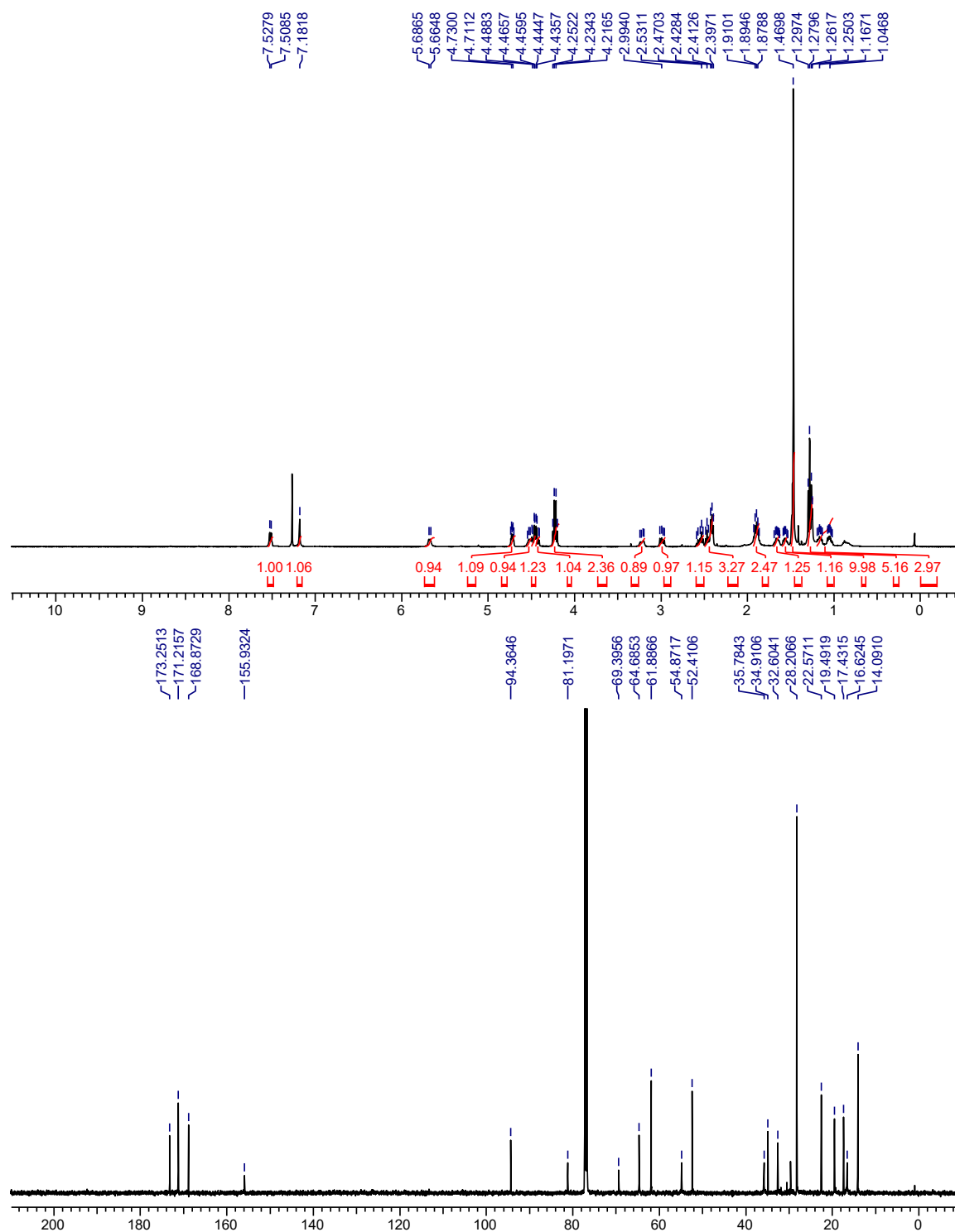
**(S)-2-(1-((R)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-(tritylthio)propanamido)cyclopropane-1-carboxamido)-3-ethoxy-3-oxopropyl 6-bromohex-5-ynoate (2.38):**



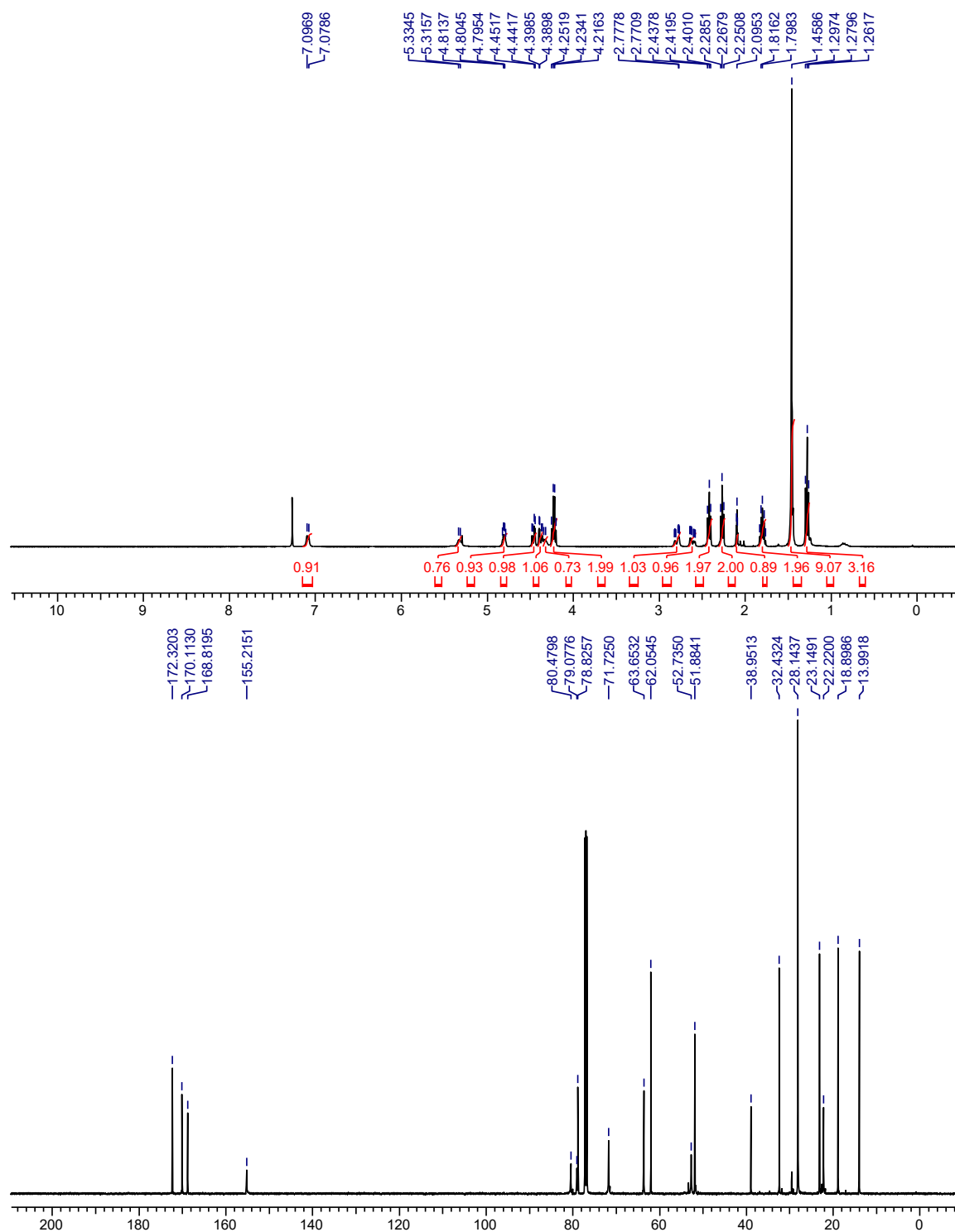
**(S)-2-(1-((R)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-mercaptopropanamido)cyclopropane-1-carboxamido)-3-ethoxy-3-oxopropyl 6-bromohex-5-ynoate (2.39) :**



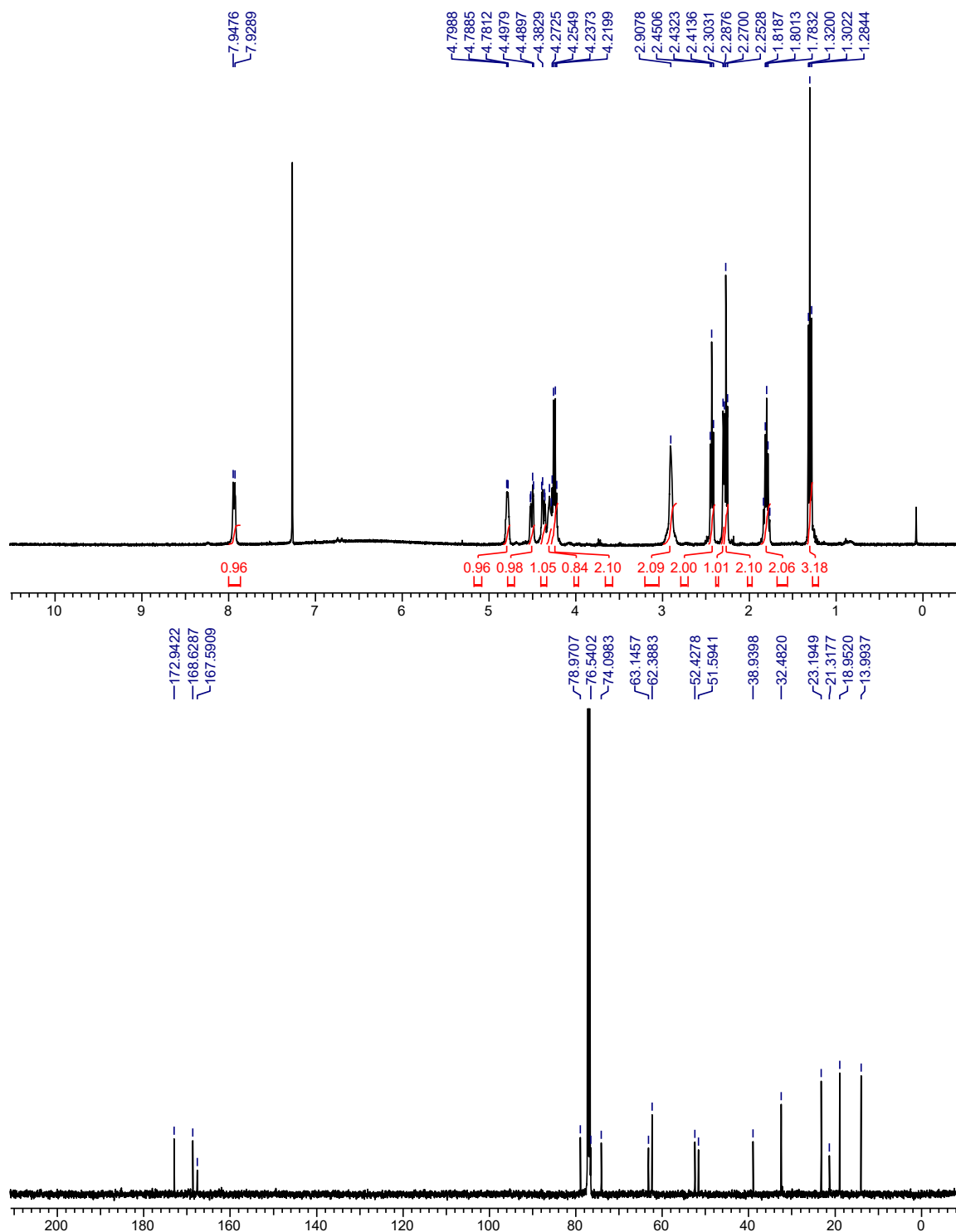
**Ethyl(6*R*,17*S*)-6-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5,14,19-trioxo-15-oxa-8-thia-4,18-diazaspiro[2.16]nonadec-9-yne-17-carboxylate (2.40) :**



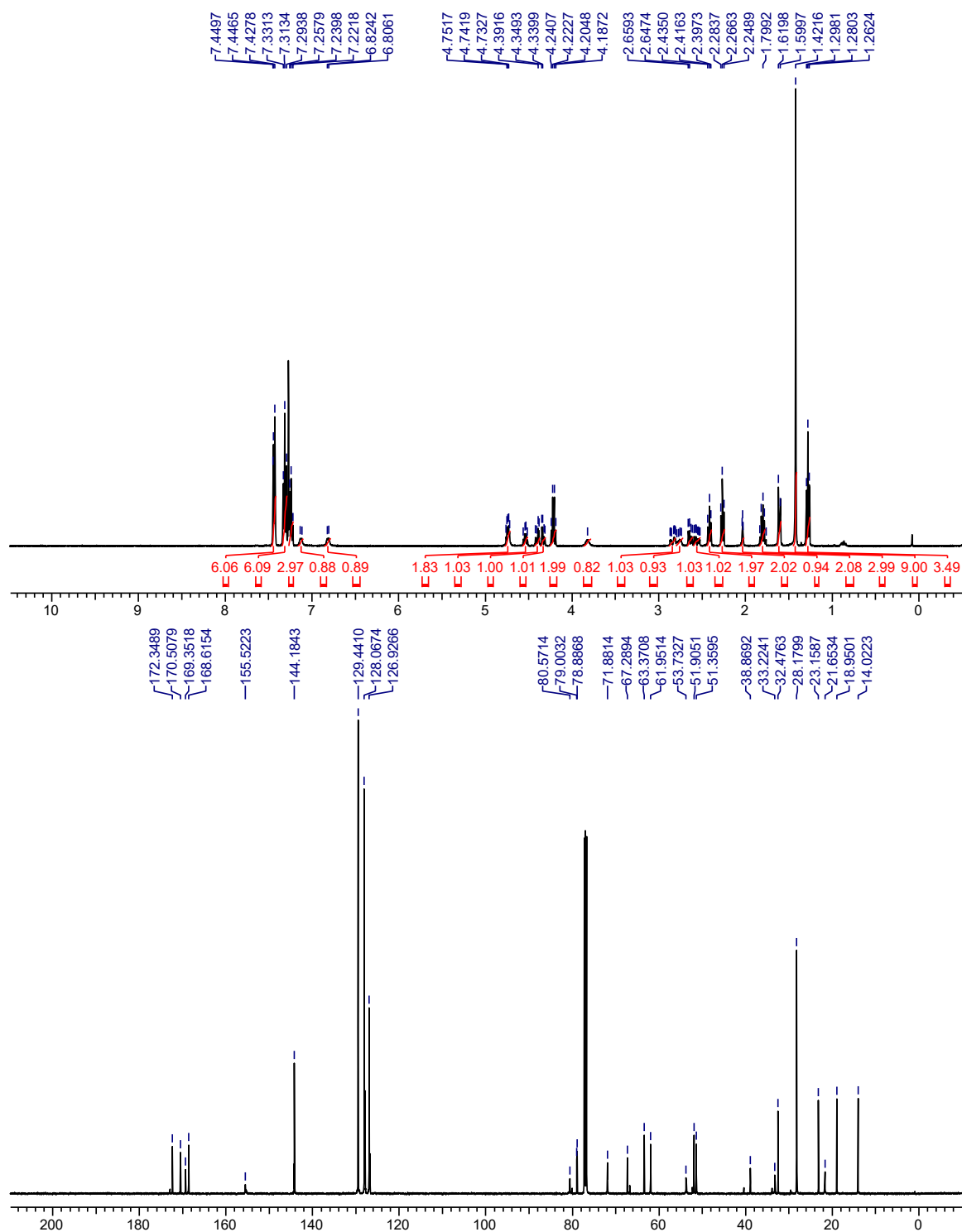
**(S)-2-((S)-2-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)pent-4-ynamido)-3-ethoxy-3-oxopropyl-6-bromohex-5-ynoate (2.42) :**



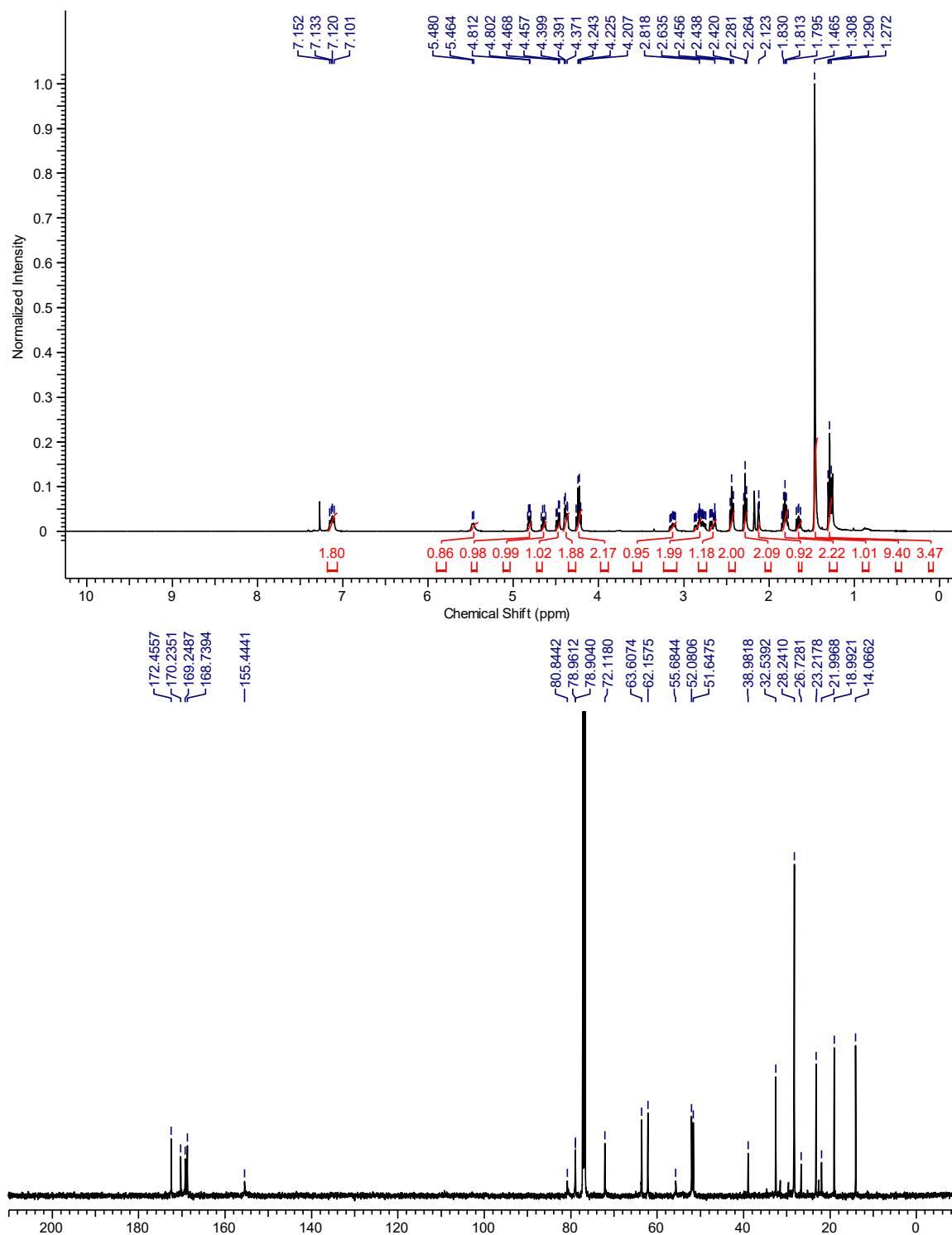
**(S)-2-((S)-2-aminopent-4-ynamido)-3-ethoxy-3-oxopropyl 6-bromohex-5-ynoate (2.43):**



**Ethyl(6*R*,9*S*,12*S*)-12-(((6-bromohex-5-ynoyl)oxy)methyl)-2,2-dimethyl-4,7,10-trioxo-9-(prop-2-yn-1-yl)-6-((tritylthio)methyl)-3-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-oate (2.44):**



**Ethyl(6*R*,9*S*,12*S*)-12-(((6-bromohex-5-ynoyl)oxy)methyl)-6-(mercaptomethyl)-2,2-dimethyl-4,7,10-trioxo-9-(prop-2-yn-1-yl)-3-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-oate (2.45) :**



**Ethyl(3*S*,6*S*,9*R*)-9-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5,8,17-trioxo-6-(prop-2-yn-1-yl)-1-oxa-11-thia-4,7-diazacycloheptadec-12-yne-3-carboxylate (2.46):**

